



## Diplomová práce

# Vývoj vícevrstvých nanovláknenných materiálů pro neurochirurgické aplikace

*Studijní program:*

N0723A270001 Textilní inženýrství

*Autor práce:*

**Bc. Pavel Děkan**

*Vedoucí práce:*

Ing. Markéta Klíčová

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Liberec 2023



## Zadání diplomové práce

# Vývoj vícevrstvých nanovlákných materiálů pro neurochirurgické aplikace

*Jméno a příjmení:*

**Bc. Pavel Děkan**

*Osobní číslo:*

T20000300

*Studijní program:*

N0723A270001 Textilní inženýrství

*Zadávající katedra:*

Katedra netkaných textilií a nanovlákných materiálů

*Akademický rok:*

2022/2023

## Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerše současného stavu poznání na poli antiadhezivních nanovlákných vrstev.
2. Vypracování literární rešerše ohledně durální rekonstrukce, aktuální materiálová řešení regenerace tvrdé pleny mozkové.
3. Vývoj vícevrstvých biokompatibilních vrstev s antiadhesivními vlastnostmi.
4. Kompletní charakterizace materiálů (morfologické vlastnosti, ověření cytokompatibility).
5. Diskuse výsledků, porovnání s aktuální literaturou.

*Rozsah grafických prací:* dle potřeby dokumentace  
*Rozsah pracovní zprávy:* 40-60 dle potřeby  
*Forma zpracování práce:* tištěná/elektronická  
*Jazyk práce:* čeština

### **Seznam odborné literatury:**

- [1] BACAKOVA, Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUMIL a Vaclav SVORCIK, 2011. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online]. 29(6), 739–767. ISSN 1873-1899. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004
- [2] NASAJPOUR, Amir, Serena MANDLA, Sindu SHREE, Ebrahim MOSTAFAVI, Roholah SHARIFI, Akbar KHALILPOUR, Saghí SAGHAZADEH, Shabir HASSAN, Michael J. MITCHELL, Jeroen LEIJTEN, Xu HOU, Alireza MOSHAVERINIA, Nasim ANNABI, Rainer ADELUNG, Yogendra Kumar MISHRA, Su Ryon SHIN, Ali TAMAYOL a Ali KHADEMHOSEINI, 2017. Nanostructured Fibrous Membranes with Rose Spike-Like Architecture. *Nano Letters* [online]. 17(10), 6235–6240. ISSN 1530-6992. Dostupné z: doi:10.1021/acs.nanolett.7b02929
- [3] WU, Wei, Ruoyu CHENG, José DAS NEVES, Jincheng TANG, Junyuan XIAO, Qing NI, Xinnong LIU, Guoqing PAN, Dechun LI, Wenguo CUI a Bruno SARMENTO, 2017. Advances in biomaterials for preventing tissue adhesion. *Journal of Controlled Release* [online]. 261, 318–336. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2017.06.020

*Vedoucí práce:* Ing. Markéta Klíčová  
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

*Datum zadání práce:* 1. listopadu 2022  
*Předpokládaný termín odevzdání:* 2. června 2023

L.S.

doc. Ing. Vladimír Bajzík, Ph.D.  
děkan

doc. Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Liberci dne 1. listopadu 2022

## Prohlášení

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

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

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

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

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

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

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

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat Ing. Markétě Klíčové za skvělé vedení této práce a všechny zkušenosti, které mi dokázala předat. Poděkování patří také Ing. Jakubu Erbenovi za pomoc při zvlákňování nanovláknenných vrstev a Ing. Zdeňce Hodkové za pomoc při práci v laboratořích. V neposlední řadě děkuji všem svým kamarádům a kolegům, kteří mě podporovali a pomáhali mi. Hlavní poděkování však patří mé mamince, jež mi vždy dodala útěchu a podporu v časech, kdy to bylo opravdu potřeba.

## **Anotace**

Diplomová práce je tematicky směřována na téma durálních náhrad v neurochirurgii. Cílem práce bylo vyrobit jednovrstvé a dvojevrstvé nanovláknenné materiály z daných polymerů pro využití jako durální substituenty. V teoretické části je popsána technologie elektrostatického zvlákňování, použité polymerní materiály a problematika durálních substituentů. Experimentální část je zaměřena na popis pracovních postupů a zpracování výsledků měření, která byla na jednotlivých vrstvách provedena.

## **Klíčová slova**

nanovláknenné vrstvy, elektrostatické zvlákňování, neurochirurgie, durální náhrady

## **Annotation**

The thesis is thematically focused on the topic of dural substitutes in neurosurgery. The aim of the thesis was to fabricate single and double layer nanofibrous materials from given polymers for use as dural substitutes. The theoretical part describes the electrostatic softening technology, the polymer materials used and the issue of dural substitutes. The experimental part is focused on the description of the working procedures and the processing of the evaluation of the measurements carried out on the individual layers.

## **Key words**

nanofibrous layers, electrospinning, neurosurgery, dural substitutes

## Obsah

|  |    |
|--|----|
| Úvod.....  | 10 |
| Teoretická část .....  | 11 |
| 1 Technologie výroby nanovláknenných materiálů .....                 | 11 |
| 1.1 Princip metody .....   | 11 |
| 1.2 Parametry ovlivňující zvlákňování .....                          | 12 |
| 2 Materiály.....   | 14 |
| 2.1 Poly-ε-kaprolakton.....  | 14 |
| 2.2 Polyvinyl alkohol .....  | 14 |
| 2.3 Polyvinyliden fluorid .....                                      | 15 |
| 3 Tkáňové inženýrství .....  | 16 |
| 4 Aplikace anti-adhezivních materiálů v medicíně .....               | 18 |
| 5 Možnosti durální rekonstrukce .....                                | 19 |
| 5.1 Přírodní materiály.....  | 20 |
| 5.2 Syntetické materiály .....                                       | 22 |
| 5.3 Porovnání biologických a syntetických durálních náhrad .....     | 23 |
| 6 Potenciální anti-adhezivní materiály pro tkáňové inženýrství ..... | 24 |
| Experimentální část.....   | 26 |
| 7 Pracovní postupy .....   | 26 |
| 7.1 Příprava polymerních roztoků.....                                | 26 |
| 7.2 Výroba nanovláknenných vrstev.....                               | 27 |
| 7.3 Sterilizace nanovláknenných materiálů.....                       | 27 |
| 7.4 Skenovací elektronová mikroskopie .....                          | 27 |
| 7.5 Smáčivost .....  | 27 |
| 7.6 Adheze vláknenných vrstev na kolagenní vrstvu.....               | 28 |
| 7.7 Cytotoxicita materiálových extraktů .....                        | 29 |
| 7.8 In vitro test buněčné adheze a proliferace.....                  | 30 |
| 7.8.1 Metabolický test CCK-8 .....                                   | 31 |
| 7.8.2 Fluorescenční mikroskopie a počet buněk.....                   | 31 |
| 7.8.3 Skenovací elektronová mikroskopie .....                        | 31 |
| 8 Hodnocení výsledků .....   | 33 |
| 8.1 Elektrostatické zvlákňování .....                                | 33 |
| 8.2 Charakterizace vyrobených nanovláknenných vrstev .....           | 35 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 8.2.1 | Morfologie nanovlákných vrstev .....                    | 35 |
| 8.2.2 | Průměr nanovláken .....                                 | 37 |
| 8.2.3 | Porozita nanovlákných vrstev .....                      | 38 |
| 8.2.4 | Smáčivost nanovlákných vrstev .....                     | 38 |
| 8.2.5 | Adheze vlákných vrstev na kolagenní vrstvu .....        | 40 |
| 8.3   | Cytotoxicita materiálových extraktů .....               | 40 |
| 8.4   | <i>In vitro</i> test buněčné adheze a proliferace ..... | 41 |
| 9     | Diskuze výsledků .....                                  | 46 |
|       | Závěr .....   | 49 |
|       | Lietratura .....  | 51 |
|       | Seznam obrázků .....                                    | 56 |
|       | Seznam tabulek .....                                    | 58 |



## Seznam zkratek

|                     |   |
|---------------------|---|
| ACSF                | Simulovaný mozkomíšní mok               |
| CCK-8               | Cell counting kit-8                     |
| (d)H <sub>2</sub> O | (Destilovaná) Voda                      |
| DMAC                | Dimethylacetamid                        |
| DMEM                | Dulbeccovo modifikované Eagleovo medium |
| NC                  | Negativní kontrola                      |
| PBS                 | Fosfátový pufr                          |
| PC                  | Pozitivní kontrola                      |
| PCL                 | Poly-ε-kaprolakton                      |
| PVA                 | Polyvinyl alkohol                       |
| PVDF                | Polyvinyliden fluorid                   |
| SEM                 | Skenovací elektronová mikroskopie       |

## Úvod

Adhezivita materiálů je v medicíně důležitým tématem. V každé medicíně aplikaci je nutné dopředu stanovit, zda má být materiál adhezivní (přilnavý), či anti-adhezivní (nepřilnavý) k lidským tkáním.

V medicínských aplikacích jsou anti-adhezivní materiály využívány zejména jako pooperační opatření. Cílem je zabránit srůstání úrazem, či chirurgicky zjištěné tkáně s tkáněmi okolních orgánů nebo s dalšími částmi lidského těla. Zároveň jsou anti-adhezivní materiály i jistou ochranou proti infekci, čili jsou ochranou vůči bakteriím, virům a dalším nežádoucím částicím, které se v lidském těle běžně vyskytují a jsou negativním vlivem při regeneraci postiženého místa. Biomateriály, které hrají velkou roli v prevenci tkáňového srůstání, získávají na důležitosti jako struktury využívané při chirurgických zákrocích. Při těchto zákrocích mohou být použity jedno i vícevrstvé membrány z nanovláken, hydrogely či absorbovatelné biofilmy [1, 2].

Úrazy a neurochirurgické zákroky obvykle vedou k perforaci nebo odstranění tvrdé pleny. Ve většině těchto případů je dura vodotěsně zacelena, aby se zabránilo poškození tkání a úniku mozkomíšního moku. V současné době se jako náhrady tvrdé pleny používá řada materiálů, včetně autogenních, alogenních, xenogenních graftů a nebiologických syntetických materiálů. Ideální náhrada tvrdé pleny by měla adekvátně obnovit celistvost tvrdé pleny a zabránit úniku mozkomíšního moku a zároveň minimalizovat riziko infekce. Mechanické vlastnosti materiálu by měly usnadňovat šití nebo lepení, ale také napodobovat poddajnost přirozené tvrdé pleny, aby bylo možné snadno překrývat tkáně. Kromě toho ideální náhrada tvrdé pleny minimalizuje lokální zánět tkáně a přednostně podpoří infiltraci buněk a vaskularizaci, aby se urychlila rekonstrukce nativní tvrdé pleny, aniž by vyvolala nežádoucí výsledky fibrózy nebo tkáňových adhezí [3].

## **Teoretická část**

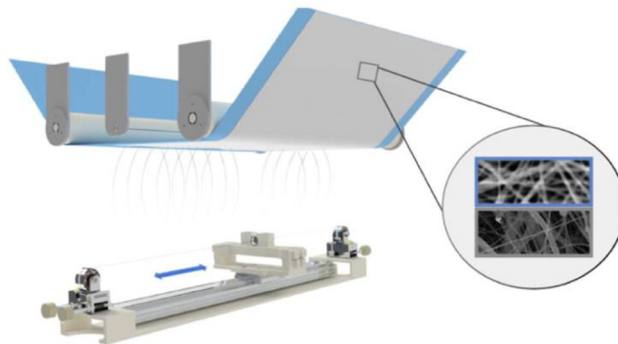
V následujících kapitolách je popsána technologie elektrostatického zvlákňování s materiály, které byly dále použity v části praktické. Je zde sepsán i drobný úvod do problematiky umělých náhrad mozkových plen.

### **1 Technologie výroby nanovláknenných materiálů**

Nanovláknenné materiály, ať už ve formě plošných nebo prostorových struktur, jsou vysoce porézní s velkým měrným povrchem. Velice jemná struktura vzniklých materiálů je velmi podobná strukturám v tkáních. V dnešní době existuje řada technologií, kterými lze docílit vzniku nanovláken. V této kapitole bude popsána technologie elektrostatického zvlákňování, která se řadí mezi nejběžnější procesy pro výrobu nanovláknenných struktur a byla také vybrána jakožto výchozí technologie diplomové práce [4].

#### **1.1 Princip metody**

Technologie elektrostatického zvlákňování, jinak nazývaná také jako electrospinning (Obrázek 1), je jedna z nejčastěji využívaných technologií pro výrobu nanovláken. Základním principem elektrostatické výroby nanovláken je využití rozdílů elektrických potenciálů mezi zvlákňovací elektrodou a kolektorem, na kterém jsou zachytávána vznikající nanovláknena. Zvlákňovaný polymer, který je dávkován na elektrodu se může vyskytovat ve formě polymerního roztoku či taveniny. Během procesu je využíváno buď střídavé či stejnosměrné napětí. Pokud je na zvlákňovaný materiál aplikováno dostatečně silné vysoké napětí, dojde k jeho nabití a elektrostatické přitažlivé síly působící proti povrchovému napětí způsobí protažení kapky. Při dosažení kritického bodu, dochází k vytrysknutí vznikajícího vlákna z povrchu zvlákňovaného materiálu. Tomuto jevu se říká Taylorův kužel. Při dostatečné soudržnosti materiálu dojde k vytvoření stabilního jádra bez jakéhokoliv přerušení. Během „letu“ dojde k vyschnutí trysky z důvodu odpaření rozpouštědla. Dále dojde k prodloužení a vlivem elektrostatického odpuzování také k usazení vzniklého vlákna na opačně nabitým kolektoru v nahodilém směru a vzniká tak souvislá vláknenná vrstva [5].



*Obrázek 1: Schéma bezjehlového electrospinningu ze struny [6]*

Zvlákňovací elektroda může být ve formě tyčky, jehly, struny či válečku. V posledních letech se jako nejefektivnější a nejvíce produktivní forma osvědčila forma struny, díky které je zvlákňování prováděno po celé její délce a vzniká tedy více vláken na jednou. Vedle tvaru elektrody jsou při výrobě nanovláken také důležité faktory jako viskozita zvlákňované kapaliny, její povrchové napětí a elektrická vodivost [5].

V této diplomové práci bylo využito pro získání vlákně vrstvy bezjehlové elektrostatičké zvlákňování. Jako zvlákňovací aparát byla využita struna. Tato metoda se používá především v průmyslové výrobě nanovlákněných vrstev. Princip spočívá na dávkování zvlákňovacího materiálu přímo na povrch struny, kde se vytvoří tenký film. Zvlákňování probíhá po celém povrchu struny a dochází k tvorbě mnoha Taylorových kuželů najednou. Dále dochází k jejich protažení a vzniku samotných vláken ukládaných na opačně nabitý kolektor. Pomocí této metody dojde k vysoké produktivitě. Na tomto principu je založeno např. zařízení Nanospider<sup>TM</sup>, které bylo také použito jako výchozí zařízení [7].

## **1.2 Parametry ovlivňující zvlákňování**

Během zvlákňování mají velký vliv na tvorbu vláken jak procesní parametry, tak parametry samotného materiálu. Tyto parametry ovlivňují nejenom samotný proces celého zvlákňování ale také výsledné vlastnosti vláken a vzniklé vlákně vrstvy. Nutné je si uvědomit, že parametry působí nejen ve vzájemném souladu ale také proti sobě, je tedy nutné najít optimální hodnoty jednotlivých parametrů.

Procesními parametry jsou myšleny veškeré parametry, které můžeme sami ovlivnit jejich nastavením na zařízení. Řadí se sem např. typ spinnerety. Dále lze zařadit například kolektor, u kterého můžeme měnit jeho vzdálenost od spinnerety. Mezi další parametry můžeme zařadit také dávkování zvlákňovaného materiálu či nastavení okolních podmínek, které hrají velkou roli při samotném zvlákňování. Velkou roli hraje také hodnota použitého elektrického napětí a typ použitého vysokonapěťového zdroje [7, 8, 9].

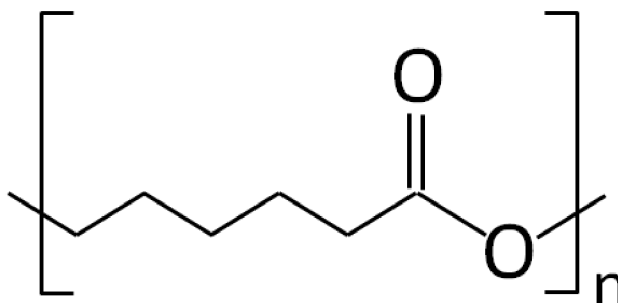
Materiálové parametry jsou dány samotným použitým materiálem. Ať už se jedná o roztok či taveninu, je důležité dbát na výběr polymeru, jeho druhu, složení, molekulové hmotnosti, typu rozpouštědlového systému a mnoho dalších. Materiálové parametry stejně jako procesní parametry ovlivňují výslednou podobu, strukturu a schopnost zvláknění provést [7, 8, 9].

## 2 Materiály

V následujících podkapitolách budou popsány materiály, které byly během experimentální části práce použity. Konkrétně se jedná o polymery poly- $\epsilon$ -kaprolakton, polyvinyl alkohol a polyvinyliden fluorid.

### 2.1 Poly- $\epsilon$ -kaprolakton

Poly- $\epsilon$ -kaprolakton (PCL) je polymerem ze skupiny polyesterů a vzniká polymerizací  $\epsilon$ -kaprolaktonu za otevření cyklu, nebo volnou radikálovou polymerizací 2-methylen-1,3-dioxepanu za otevření cyklu [10]. Strukturální vzorec PCL lze vidět na Obrázku 2.

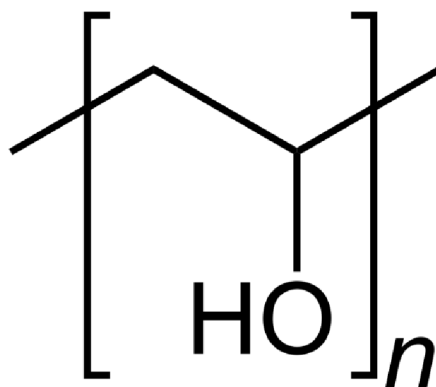


Obrázek 2: Strukturální vzorec poly- $\epsilon$ -kaprolaktonu [11]

Jedná se o biodegradabilní a biokompatibilní polymer s teplotou tání v rozmezí 59-64 °C. Díky degradační vlastnosti a kompatibilitě s živými organismy je snaha z tohoto polymeru vyrábět různé tkáňové a lékové nosiče v oboru tkáňového inženýrství. Semi-krytalická struktura a nesmáčivost společně zajišťují dobu degradace zhruba 6 měsíců v biologicky aktivním prostředí [10].

### 2.2 Polyvinyl alkohol

Polyvinyl alkohol (PVA) je biodegradabilní a biokompatibilní polymer a vzniká hydrolyzou polyvinyl acetátu odštěpením acetátových skupin. Strukturální vzorec PVA lze vidět na Obrázku 3. Teplota tání PVA v rozmezí zhruba 180-240 °C je vyšší, než jeho teplota degradace při 180 °C [12, 13].

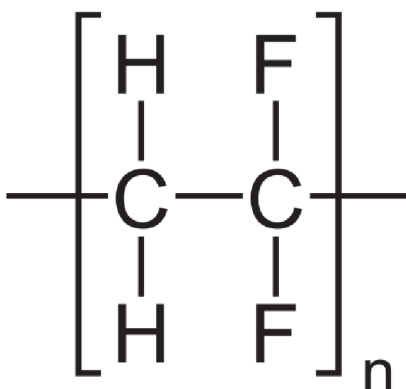


Obrázek 3: Strukturální vzorec polyvinyl alkoholu [14]

PVA je běžně používán ve zdravotnických prostředcích díky svým vlastnostem nízké adsorpce proteinů, biokompatibilitě, vysoké rozpustnosti ve vodě a chemické odolnosti. Mezi nejčastější lékařská použití PVA patří měkké kontaktní čočky, oční kapky, bariéry proti adhezi tkání a umělé chrupavky a menisky [13].

### 2.3 Polyvinyliden fluorid

Polyvinylidenfluorid (PVDF) je biokompatibilním, avšak nebiodegradabilním polymerem ze skupiny termoplastů. Teplota tání tohoto polymeru je zhruba 177 °C, je nerozpustný ve většině rozpouštědel a vykazuje piezoelektrické vlastnosti [15]. Strukturální vzorec polymeru je uveden na Obrázku 4.

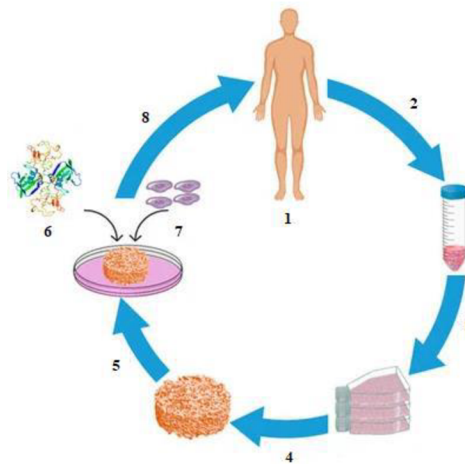


Obrázek 4: Strukturální vzorec polyvinylidenfluoridu [16]

Inertní PVDF se používá jako šicí materiál v chirurgii, v chemickém a farmaceutickém průmyslu, nebo například k výrobě polovodičů v elektrotechnice [15].

### 3 Tkáňové inženýrství

Pojem tkáňové inženýrství popisuje obor, který propojuje znalosti inženýrství a přírodních věd. Jedná se o rozvíjející se obor, který má do budoucna velký potenciál. Jeho cílem je pomoci v oblasti medicíny, a to zejména ve vývoji, při opravách tkání či plně funkčním nahrazení např. tkání, kloubů, za použití biokompatibilních materiálů a buněk. Vznikem tkáňového inženýrství dochází k vyřešení situace s nedostatkem dárců tkání a orgánů, která je v dnešní době, ale i do budoucna, stále velmi kritická. Princip tkáňového inženýrství je jednoduše vyobrazen a popsán na Obrázku 5, uvedeném níže [17, 18].



Obrázek 5: Zjednodušený princip tkáňového inženýrství. 1 - pacient, 2 - izolace buněk, 3 - buněčná expanze, 4 - 3D scaffold, 5 - tkáňový vývoj, 6 - růstové faktory, 7 - buňky, 8 - implantace [18]

Základem je prvotní izolace vhodné buňky, která je pro daný typ náhrady žádoucí. Buňky jsou dále kultivovány v kultivačním médiu v nádobách. Takto připravené buňky jsou díky vhodnému prostředí schopny růst a dále se množit, dochází k tzv. proliferaci. Při dosažení požadovaného množství buněk, dochází k jejich samotnému nasazení na předem vyrobený tkáňový nosič, neboli scaffold. Po adhezi a proliferaci buněk na scaffoldu a za přispění růstových faktorů jsou buňky dále kultivovány. V poslední fázi je osazený scaffold implantován na postižené místo pacienta. Tento způsob se využívá při operacích pro nahrazení např. kostí, cév, chrupavek a dalších tkání, které by nemohly být jiným způsobem vyrobeny a použity [18].



Obecně je scaffold prvek, sloužící jako kostra pro nanesení buněk na jeho prvek a kde po určité době kultivace je možné ho usadit a nahradit jím určitou část lidského těla, která vyžaduje opravu, či úplnou náhradu. Velký důraz je kladen především na samotné vlastnosti scaffoldu. Je potřeba zajistit, že materiál, ze kterého je vyroben nebude nijak negativně zasahovat do lidského organismu a nebude způsobovat žádné závažné problémy. Mezi pozorované vlastnosti řadíme pórovitost, biokompatibilitu, biodegradaci ale také mechanické vlastnosti či povrchové vlastnosti [18, 19].

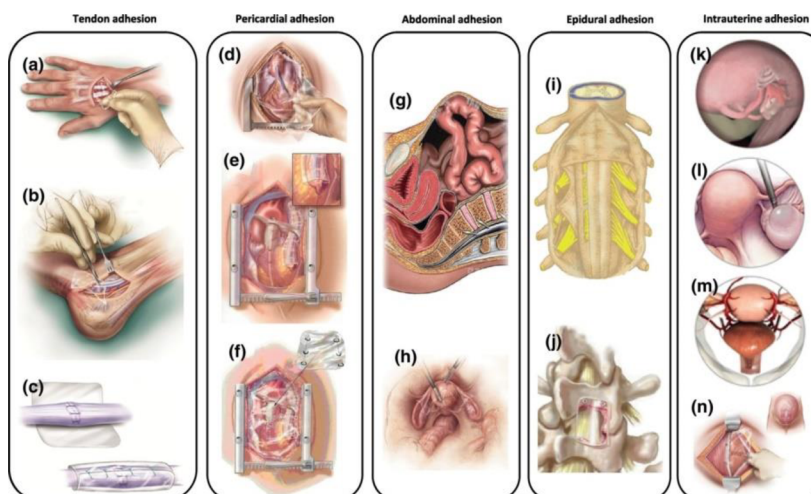
Dochází v podstatě k nahrazení samotné mimobuněčné hmoty. Scaffold má stejně jako hmota tvar, strukturu ale i vlastnosti určené dle typu nahrazované tkáně. Dle typu náhrady dělíme scaffoldy na vlákenné a nevlákenné. Pro výrobu vlákenných nosičů jsou využívány klasické textilní technologie jako je tkaní či pletení, ale také modernější a novější technologie např. pro výrobu netkaných textilií či technologie využívané pro výrobu nanovlákenných struktur. Tyto technologie se v posledních letech využívají nejvíce, a to především k největší podobnosti výsledného vlákenného produktu s mezibuněčnou hmotou v tkáních [17, 18].

## 4 Aplikace anti-adhezivních materiálů v medicíně

Tkáňové srůsty, což jsou nežádoucí struktury, se objevují zejména po operacích, ale i infekci, zranění nebo i po ozáření radiací. Tyto struktury mohou být definovány jako nežádoucí vláknité spoje mezi jinak nespojenými orgány a tkáněmi. Tkáňové srůsty se mohou projevovat bolestivostí, či omezenou funkcí postiženého místa (šlachy atd.) [3].

Způsoby prevence tkáňové adheze vycházejí buď z přímé péče o poškozené tkáň, nebo z aplikace biomateriálů. Metody založené na přímé péči o tkáň zahrnují eliminaci procesů tvorby tkáňové adheze, konkrétně zmírnění zánětu a vnitřního krvácení tkání, omezení ukládání a srážení fibrinu a ochranu povrchu rány před třením. Jedním z cílů léčby je i potlačování fibroblastů, buněk odpovědných za produkci fibrinu, který pak iniciuje nadměrný růst tkání. Metody založené na biomateriálech využívají pro zabránění adheze tkání fyzikálních a chemických vlastností jednotlivých materiálů. Biomateriály zde působí jako fyzické bariéry nebo bioaktivní látky, které jsou schopné adhezi potlačit [20].

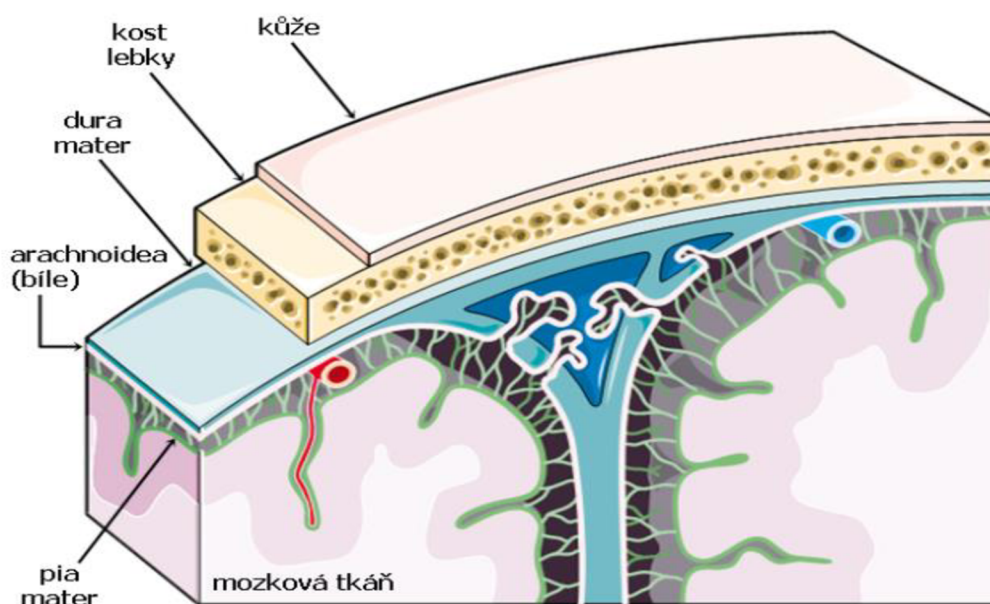
Tkáňové srůsty se mohou objevovat zejména po operacích šlach, srdce, orgánů v dutině břišní nebo mozku a míchy (Obrázek 6) [20].



Obrázek 6: Ilustrační zobrazení aplikačních oblastí biomateriálů v regenerativní medicíně (a, b, c – šlachová adheze; d, e, f – perikardiální adheze; g, h – adheze v dutině břišní; i, j – epidurální adheze; k, l, m, n – nitroděložní adheze) [20]

## 5 Možnosti durální rekonstrukce

Dura mater neboli tvrdá plena, je vazivová membrána tvořená hustou sítí kolagenních vláken s menším množstvím vláken elastinových. Společně s pavučnicí (arachnoidea) a omozečnicí (pia mater), znázorněné na Obrázku 7, je jednou z vrstev tvořících obal centrální nervové soustavy – mozku a míchy. Dura mater je vnější vrstvou tohoto mozkového obalu. S piou mater a arachnoideou zadržují mozkomíšni mok v okolí mozku a míchy a tím je chrání proti prudkým otřesům a jejich možnému poranění o tvrdou lebeční kost či páteř [20].



Obrázek 7: Schéma výřezu lebeční dutiny se znázorněnými mozkovými plenami [21]

Při neurochirurgických operacích představují durální poruchy významný problém jak pro pacienta, tak pro chirurga, protože neúplné uzavření může vést k úniku mozkomíšního moku a souvisejícím komplikacím. Zhoršené hojení durálních defektů a neúplné uzavření spojené s rozsáhlými a opakovanými neurochirurgickými zákroky, jsou obtížně léčitelné a mají četná rizika. Tyto durální defekty lze rekonstruovat pomocí řady umělých nebo přírodních materiálů. Doposud však nebyla vyvinuta jednotná strategie, pokud jde o techniky používané k uzavírání durálních defektů [22].

Na konci 19. století si mnoho chirurgů všimlo, že traumatická epilepsie způsobená jizvami vzniklými po traumatickém poranění mozku je odezvou k chirurgické léčbě. Poté byly navrženy různé metody vkládání umělých materiálů do rány. Nejprve zkoušeli používat drobné pláty inertních kovů, jako jsou zlato, stříbro nebo platina. Další lidé používali nekovové štěpy, gutaperčové nebo celuloidové destičky. Tyto rané pokusy byly zklamáním, protože tělo odmítalo cizorodé materiály různými způsoby, např. destrukcí destiček infiltrující pojivovou tkáň a vytvářením hrubých adhezí mezi mozkem a překrývajícími se tkáněmi [23].

## 5.1 Přírodní materiály

Již před sto lety byly pokusy použít biologické materiály jako transplantáty. Freeman (1908) a Saar (1911) provedli testy na psech a králících, kde byl defekt dury mater uzavřen vaječným filmem. Výsledky odhalily vytvoření pouzdra pojivové tkáně, histologicky podobné tkáni dury mater, které bránilo rozvoji adhezí za předpokladu, že spodní membrány a kůra zůstaly intaktní. Pokud však byly poškozeny spodní tkáňové vrstvy, riziko adhezí se významně zvýšilo. Tento cizorodý materiál navíc tělo také odmítlo, což často vyústilo v infekci [23].

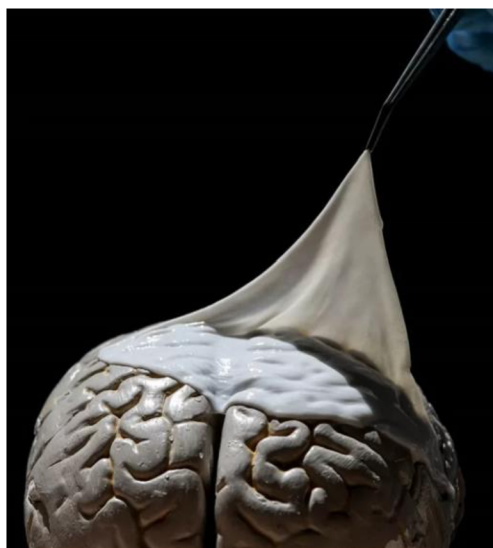
Významný přínos měla technika využití autologních materiálů. Při tomto přístupu se do oblasti defektu transplantuje část pacientovy vlastní tkáně, nejčastěji fascie či okostice, což výrazně pomohlo zabránit odmítnutí implantátu tělem pacienta. Ovšem i zde se objevily komplikace spojené s tkáňovou adhezí [23].

Inovace v technikách uchování biologických kadaverózních tkání (i. e. od zemřelých pacientů), využívaných jako alogenní náhrady, vědcům umožnily sklízet větší množství materiálů pro potenciální plastickou chirurgii a uchovávat je po delší dobu. Byly navrženy různé metody používané k tomuto účelu (úprava formalínem, lyofilizace, zmrazení). Mezi nimi byla ke konzervaci kadaverózní dury nejčastěji používána lyofilizace. V současné době se tyto implantáty prakticky nepoužívají z důvodů poměrně silné imunitní odpovědi příjemce, právních problémů s odstraněním kadaverózní dury mater a možnosti přenosu patogenů (HIV, hepatitida, syfilis, prionové infekce) [23].

Po neúspěších a neuspokojujících výsledcích s alogenními a autologními náhradami přišel vývoj xenologních durálních náhrad. Ty jsou produkovány ze zvířecího kolagenu

a upraveny tak, aby u příjemce nevyvolávaly odezvu imunitního systému. Nejčastěji používané transplantáty se připravují z hovězího perikardu, hovězí Achillovy šlachy, hovězí plodové kůže, tkáň tenkého střeva prasete nebo z koňského kolagenu. Xenologní durální náhrady umožňují stimulaci buněčné proliferace a regeneraci pacientovi vlastní durální tkáň. Existuje více metod implantace takovéto náhrady a to šití, či aplikace tmelů, gelů a lepidel. Použití kolagenových štěpů má řadu výhod. Kolagenový implantát je jednoduše a snadno použitelný, snadno se přizpůsobí povrchu podkladových tkání, což umožňuje chirurgovi uzavřít defekty jakéhokoli tvaru, zabraňuje tvorbě durálně-mozkových jizev, svými vlastnostmi je velmi podobný vlastní duře a je do 6 měsíců nahrazen tkáněmi pacienta [23].

K dnešnímu dni existuje velký sortiment kolagenových transplantátů určených k náhradě defektů dury mater, např. Durepair (Medtronic, USA) [24], DuraGen (Integra LifeSciences Corporation, USA) [25], Dura-Guard (Baxter, USA) [26], Hypro-Sorb (Bioimplon, Německo) [27], Lyoplant (B. Braun, Německo) [28], Xenodura (Cardioplant, Rusko) [29], atd. Pro ilustraci kolagenních náhrad je přiložen Obrázek 8 s produktem Xendura.

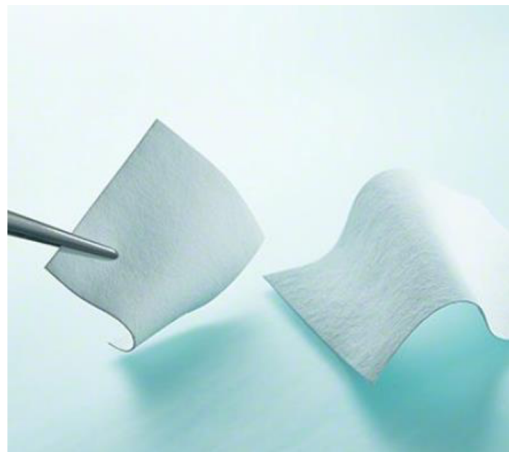


*Obrázek 8: Ilustrační snímek produktu Xenodura společnosti Cardioplant [29]*

## 5.2 Syntetické materiály

V posledních letech ve světě vzrůstá zájem o vysokomolekulární syntetické elastické polymery, které prakticky nezpůsobují akutní tělesnou odezvu, a lze s nimi pohodlně manipulovat. Použití těchto materiálů pro rekonstrukci dury mater není spojeno s dodatečným chirurgickým zákrokem (který je často nutný při odběru autologních náhrad), reakce okolních tkání na lékařské polymery je relativně nízká a krátkodobá, protože tyto materiály jsou biochemicky inertní a nepřispívají k žádné antigenní nekompatibilitě. Polymerní produkty lze vyrábět v libovolném množství, v různých tvarech a velikostech; nevyžadují zvláštní konzervaci; jsou snadno sterilizovatelné a lze je během operace remodelovat [23].

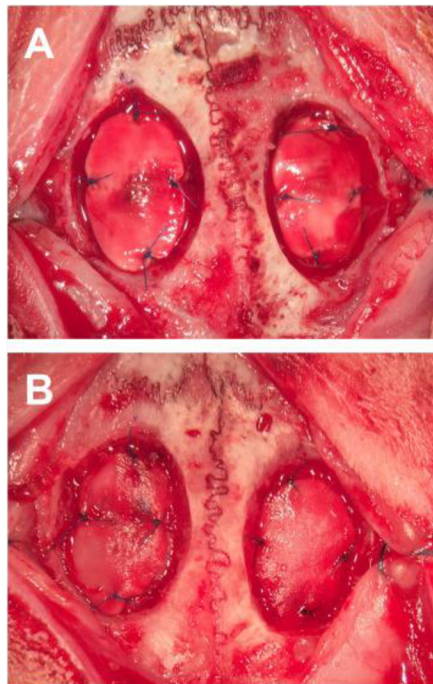
V současné době existuje velké množství vstřebatelných i nevstřebatelných syntetických materiálů s různým chemickým složením: teflon, polypropylen, polymery s přídavkem silikonu atd. Jedním z nejčastěji používaných transplantátů je membrána GORE PRECLUDE (WL Gore & Associates, USA) [30] a jedná se vícevrstvou membránu z taženého polytetrafluoretylenu. GORE PRECLUDE je však hydrofobní, nedegradibilní materiál, který musí být upevněn stehy a v důsledku toho se vytrácí vodotěsnost. Zůstává po neomezenou dobu jako cizí materiál uvnitř lebeční dutiny, což samozřejmě zvyšuje riziko srůstů a infekce v dlouhodobém pooperačním období. Dalším známějším materiálem je membrána Neuro-Patch (B. Braun, Německo) [31], viz Obrázek 9. Skládá se z mikroporézního netkaného materiálu vyrobeného z vysoce čistého polyesteruretanu, který umožňuje rychlé prorůstání pojivové tkáně do trans-plantátu [23].



Obrázek 9: Ilustrační snímek produktu Neuro-Patch společnosti B. Braun [31]

### 5.3 Porovnání biologických a syntetických durálních náhrad

Ve výzkumu MacEwana byla porovnána funkčnost zesíťované kolagenní náhrady DuraMatrix (Stryker, Inc., USA) a plně syntetické nanovrstvy Cerafix (Acera Surgical, Inc., USA). Obě náhrady byly při samotné operaci vyhodnoceny jako dostatečně efektivní v zakrytí durálního defektu, avšak nanovrstvy byly chirurgy označeny jako tenčí, více poddajné, lépe splývající s podložní nativní durou a snadněji suturovatelné, než kolagenní produkt [3]. Implantované materiály lze vidět na Obrázku 10.



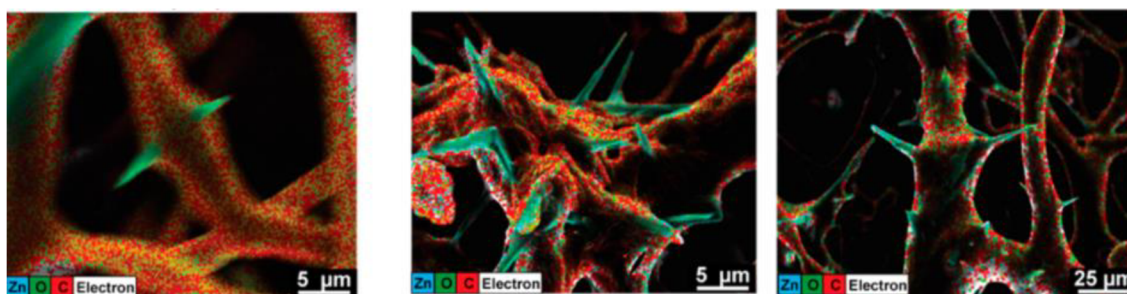
Obrázek 10: Implantované durální náhrady (A – syntetická nanovrstva Cerafix; B – kolagenní náhrada DuraMatrix) [3]

V průběhu čtyřtýdenního pozorování pokusných zvířat (Novozélandští bílí králíci) nebyly prokázány žádné vedlejší účinky náhrad na chování, neurologickou funkci ani obecné zdraví subjektů. Po usmrcení zvířat byl kontrolován vznik infekce a únik mozkomíšního moku. U obou materiálů nebyl potvrzen vznik infekce ani únik mozkomíšního moku. Dále, z histologické analýzy bylo zjištěno, že v uplynulé době čtyř týdnů došlo k vyšší buněčné proliferaci, vyšší vaskularizaci a podpoře vzniku nové durální tkáně u syntetických nano-materiálů [3].

## 6 Potenciální anti-adhezivní materiály pro tkáňové inženýrství

Velice dobře se ve výzkumu osvědčily nanovláknenné vrstvy z kopolymeru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové a z PCL. V *in vivo* testování se ukázalo, že vrstvy z kopolymeru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové i PCL poměrně dobře, ačkoliv ne úplně, zabraňují tkáňovým adhezím. Při použití kopolymeru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové vrstvy vykazovaly vzniklé srůsty i nižší úroveň zanícení, než u ostatních použitých materiálů [32].

Pro tvorbu anti-adhezivních materiálů se využívají i materiály inspirované přírodou. Příkladem je vytvoření kompozitu nanovláken z PCL s větvenými nanočásticemi oxidu zinečnatého. Po elektrostatickém zvláknění vzniká struktura podobná trnitému stonku růže (Obrázek 11). Tento kompozit zlepšuje mechanické vlastnosti vláknenné vrstvy. Co více, tak prostorová struktura rozvětvených nanočástic oxidu zinečnatého podporuje i adhezi ke tkáním. Anti-adhezivní povaha tohoto materiálu spočívá ve výborné antibakteriálnosti, přičemž podporuje růst eukaryotních buněk [33].



Obrázek 11: Snímek z elektronového mikroskopu ukazující strukturu kompozitu nanočástic oxidu zinečnatého a PCL nanovláken [33]

Účinným anti-adhezivním materiálem se zdá být hydrogel na bázi derivátu kyseliny hyaluronové zesíťované glukózooxidázou a křenovou peroxidázou. Takováto struktura sama zgelovává při kontaktu s tělesnou tekutinou obsahující glukózu [34].

Fotozesíťující hydrogel, materiál vyvinutý na základě fotoindukované imin-zesíťovací reakce, se skládá z o-nitro-benzylalkoholu, modifikované karboxymethylcelulózy a glykolchitosanu. Za světelného záření modifikovaná karboxymethylcelulóza generuje



aldehydové skupiny, které následně reagují s aminoskupinami distribuovanými na glykochitosan, nebo na povrchu tkáně za vzniku hydrogelové bariéry, která se kovalentně váže k povrchu tkáně. Tento hydrogel je cytocompatibilní (netoxický pro buňky) a v těle rozložitelný v průběhu 14 dnů, přičemž nevykazuje známky vedlejších účinků na hojení rány. Při testech toho materiálu byla zjištěna poměrně dobrá anti-adhezivita [35].

## Experimentální část

Cílem experimentu byla výroba a testování nanovláknenných vrstev za použití PCL, PVDF a PVA pro neurochirurgický účel náhrady mozkových plen. Experimentální část práce obsahuje použité pracovní postupy a výsledky, kterých bylo dosaženo v rámci laboratorních měření. U vyrobených nanovláknenných vrstev byly hodnoceny průměry nanovláken, porozita, smáčivost vrstev, adheze vrstev na kolagenní strukturu, cytotoxicita materiálových extraktů a buněčná adheze a proliferace na vyrobených nanovláknenných vrstvách.

## 7 Pracovní postupy

V kapitole níže jsou popsány pracovní postupy, použitá zařízení a chemikálie.

### 7.1 Příprava polymerních roztoků

Poly- $\epsilon$ -kaprolakton (Sigma Aldrich, USA,  $M_w$  45 000 g/mol) byl rozpuštěn v systému chloroform:ethanol:kyselina octová (Penta Chemicals, Česká republika) v hmotnostním poměru 8:1:1. Celková koncentrace PCL v roztoku činila 16 hmotnostních %. Roztok byl míchán na magnetickém míchadle při 300 ot./min po dobu 24 hodin za pokojové teploty do úplného rozpuštění polymerního granulátu.

Polyvinyliden fluorid (Sigma Aldrich, USA,  $M_w$  180 000 g/mol) byl připraven v 26% hmotnostní koncentraci v rozpouštědlovém systému dimethylacetamid (DMAC):aceton (Penta Chemicals, Česká republika) v hmotnostním poměru 8:2. Polymerní granulát PVDF byl míchán společně s DMAC na magnetickém míchadle (300 ot./min) po dobu 24 hodin při teplotě 80°C do úplného rozpuštění polymeru. Bezprostředně před zvlákněním byl přidán v příslušném poměru aceton a roztok opět míchán, nyní po dobu 15 minut do homogenního smísení obou složek.

Polyvinyl alkohol (Sigma Aldrich, USA,  $M_w$  125 000 g/mol) byl připraven v 12% hmotnostní koncentraci rozpuštěním v destilované vodě (dH<sub>2</sub>O). Roztok byl míchán 24 hodin magnetickým míchadlem při 250 ot./min za pokojové teploty do kompletního rozpuštění polymeru.

## **7.2 Výroba nanovlákněných vrstev**

Pomocí bezjehlového elektrostatického zvláknování na zařízení Nanospider™ typu NS 1WS500U (Elmarco, Česká republika) a klimatizační jednotky NS AC150/1000/2000 (Elmarco, Česká republika) byly vyrobeny nanovlákněné vrstvy z připravených roztoků PCL, PVDF a PVA. Byly vyrobeny jednovrstvé materiály PCL a PVDF o plošné hmotnosti 30 g/m<sup>2</sup> a dvojevrstvé materiály kombinací PVDF s PVA a PVDF s PCL. Výsledná plošná hmotnost těchto dvojevrstev byla 30 g/m<sup>2</sup>, jako u jednovrstvých variant. V případě dvojevrstev byla vždy jako první vyrobena vrstva z PVDF, která byla následně povlákněna vrstvou PCL nebo PVA.

Pro ověření správnosti nastavení zařízení pro výrobu požadovaných plošných hmotností vrstev, byl vždy vyříznut kus zvlákněného materiálu o ploše 100 cm<sup>2</sup>, který byl poté zvážen na laboratorních vahách.

## **7.3 Sterilizace nanovlákněných materiálů**

Pomocí ethylenoxidu (Anprolene, Velká Británie) byly sterilizovány všechny materiály, které byly následně testovány. Procesní doba sterilizace byla 12 hodin při teplotě 37 °C a následné odvětrávání toxického ethylenoxidu za pokojových podmínek trvalo jeden týden.

## **7.4 Skenovací elektronová mikroskopie**

Pro potřeby práce sledovat vzorky vrstev pomocí SEM bylo využito zařízení TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe (TESCAN, Česka republika). Aby bylo možné vzorky touto metodou pozorovat, bylo nutné je učinit vodivými. K tomuto účelu bylo využito zařízení Quorum Q150R ES (Quorum Technologies, Velká Británie), kterým byla na připravené vzorky aplikována vrstva zlata o tloušťce 10 nm. Před pozlacením byly malé vzorky sledované materiálové vrstvy přichyceny na terčík pomocí oboustranné lepicí pásky. Pozlacené vzorky byly následně sledovány při zvětšeních 100x, 500x, 1000x, 2500x, 3000x, 5000x a 10000x. Pořízené snímky byly využity při měření průměrů nanovláken, porozity a pro sledování buněčné proliferace a adheze na vrstvách.

## **7.5 Smáčivost**

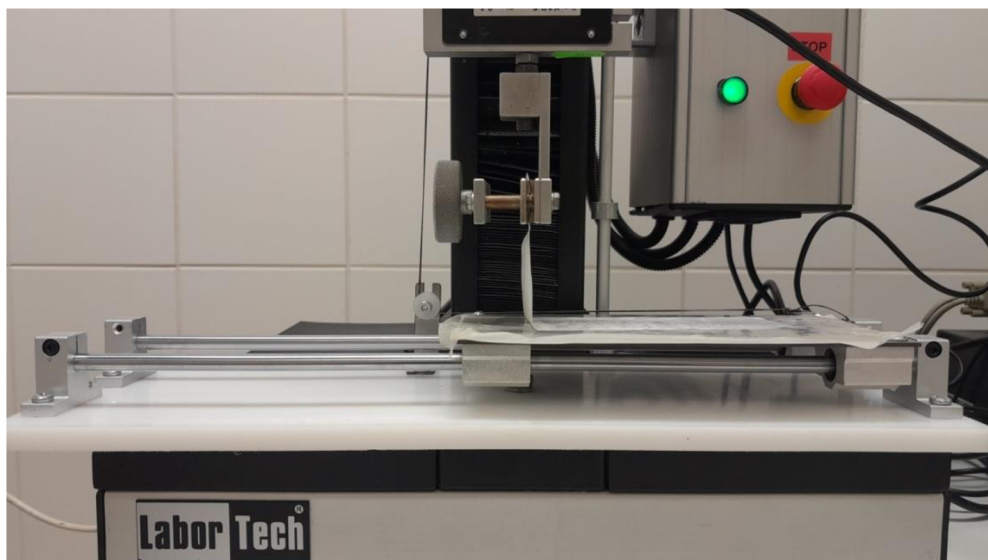
Smáčivost vyrobených a ethylenoxidem sterilizovaných nanovlákněných vrstev byla sledována měřením kontaktního úhlu na rozhraní styku materiálu, testovací kapaliny

a vzduchu. Testovacími kapalinami byla zvolena destilovaná voda (dH<sub>2</sub>O) a simulovaný mozkomíšní mok (ACSF; Biochemazone Chemazone Inc., Kanada). Pomocí oboustranné lepicí pásky byl k podložnímu sklíčku přichycen sledovaný materiál. U dvojvrstev byl materiál přilepen tak, aby sledovaná vrstva směřovala vně do volného prostřanství. Pipetou se na materiál naněsla kapka testovací kapaliny o objemu 5  $\mu$ l, která byla ihned po dosednutí snímána kamerou. Měření kontaktního úhlu probíhalo v počítačovém programu See System 7.6 (Advex Instruments, Česká republika). Na každém z pořízených snímků byly označeny tři body. Dva z nich v rozhraní tří fází, třetí pak v nejvyšším místě naněsené kapky. Programem byla z těchto bodů dokreslena kružnice, jejíž tečna v bodě na rozhraní fází materiál-kapalina-vzduch určuje společně s rovinou materiálu hledaný kontaktní úhel. Pro každou vrstvu bylo provedeno 30 měření pomocí dH<sub>2</sub>O a stejný počet měření pomocí ACSF.

## **7.6 Adheze vláknenných vrstev na kolagenní vrstvu**

Pro simulaci mozkových plen bylo vybráno uzennářské střívko z kolagenu (Devro s.r.o., Česká republika). Bylo zvažováno i použití nativní mozkové pleny, ale z důvodu obav o ohrožení bezpečnosti práce s kadaverózní tkání byla tato možnost vyloučena.

Před použitím kolagenního střívka bylo nutné jej zbavit mastnoty. Toho bylo docíleno louhováním v ethanolu. Střívko pak bylo vysušeno papírovou utěrkou a přilepeno oboustrannou lepicí páskou ke stolku na měřicím zařízení LabTest 4.050 (LaborTech s.r.o., Česká republika). Dále byly nastříhány vzorky pro každou měřenou nanovláknennou vrstvu o velikosti 50x200 mm. Testovací uspořádání lze vidět na Obrázku 12.



*Obrázek 12: Testovací uspořádání s nanovláknennou vrstvou upnutou v čelisti trhacího zařízení na kolagenní vrstvě*

Před každým měřením byla kolagenní vrstva potřena simulovaným mozkomíšním mokem. Nanovláknenné vzorky byly jedním koncem upnuty do čelisti trhacího zařízení a druhým položeny na připravenou kolagenní vrstvu, kde byly zlehka přitlačeny válečkem. Upínací délka byla nastavena na 50 mm a použitá rychlost pohybu čelisti byla 100 mm/min. Pro každou vrstvu bylo provedeno 5 opakování.

## **7.7 Cytotoxicita materiálových extraktů**

Pro hodnocení cytotoxicity byly připraveny extrakty používaných materiálů v Dulbeccově modifikovaném Eagleově mediu – DMEM (Biosera, Francie). Před přidáním média k materiálu, byl zvážený vzorek vložen do dostatečné velké zkušební a sterilizován. Extrakty byly zhotoveny louhováním nanovláknenné vrstvy v médiu o hmotnostně objemové koncentraci 100 mg materiálu na 10 ml média. Louhování probíhalo na třepačce 24 hodin při teplotě 37 °C a otáčkách třepačky 60 ot./min. Celé měření probíhalo dle normy ČSN ISO 10993:5.

Jako zkušební buňky byly použity 3T3 myší fibroblasty, pasáž 8. Do 96 jamkové destičky byla dávkována buněčná suspenze s počtem  $10^4$  buněk na jamku. Buňky nasazené v destičce byly inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační a extrakční doby, bylo louhované medium z každého materiálu přidáno ke kultivovaným buňkám. Jako negativní kontrola (NC), sloužilo čisté DMEM, které prošlo stejným procesem přípravy, jako materiálové extrakty. Pozitivní kontrolou (PC)

bylo DMEM s přidavkem 0,1 % Tritonu-X (Sigma Aldrich, USA), který je cytotoxický a buňky spolehlivě usmrcuje. Destička s buňkami v materiálových extraktech, PC i NC byla dále inkubována 24 hodin při teplotě 37 °C.

Hodnocení cytotoxicity proběhlo kalorimetrickým metabolickým testem MTT, jehož principem je redukce žlutého rozpustného MTT enzymy životaschopných buněk. Enzymatickou redukcí vzniká fialový nerozpustný formazan v podobě krystalků, které byly po odstranění media rozpuštěny v isopropylalkoholu. Destička s rozpuštěným formazanem byla vložena do spektrofotometru, kde byla měřena absorbance při záření o vlnové délce 570 nm proti referenční o vlnové délce 650 nm. Výsledná absorbance byla procentuálně přepočtena na procenta a interpretována jako životaschopnost, neboli viabilita buněk v materiálových extraktech. Absorbance NC je považována za 100% viabilitu. Limitem je 70% viabilita a výsledné hodnoty pod touto hranicí indikují cytotoxicitu extraktu.

## **7.8 In vitro test buněčné adheze a proliferace**

Pro toto testování byly připraveny materiály ve tvaru koleček o průměru 16 mm, které byly vloženy do 24jamkových destiček a zatěžkány skleněnými kroužky. Následně byly materiály nasazené v destičkách sterilizovány dle kroku popsaného v kapitole *7.3 Sterilizace nanovláknových materiálů*. Z každého materiálu bylo použito 8 vzorků pro každý jeden testovací den. Pět vzorků pro metabolický test CCK-8, jeden vzorek jako negativní kontrola, která nebyla osazena buňkami, jeden vzorek pro fluorescenční mikroskopii a výpočet buněk, jeden vzorek pak pro skenovací elektronovou mikroskopii.

Po sterilizaci bylo do každé jamky s materiálem přidáno  $10^4$  3T3 myších fibroblastů, pasáž 10, v 1 ml DMEM. Výjimkou byly jamky určené jako negativní kontrola, kam bylo, k materiálovým vzorkům, přidáno pouze čisté DMEM bez buněk. Do 24jamkových destiček pro sledování v jednotlivých testovacích dnech, bylo přidáno také pouze samotné DMEM s buňkami, jako pozitivní kontrola do tří prázdných jamek.

Sledování metabolické aktivity nasazených buněk probíhalo v časovém úseku 14 dní, testy pak byly prováděny po 1, 7 a 14 dnech buněčné kultivace v 24jamkových destičkách.

### **7.8.1 Metabolický test CCK-8**

Principem tohoto testu je dehydrogenázová redukce tetrazoliové soli WST-8 obsažené v CCK-8 (Cell counting kit-8; Sigma Aldrich, USA) na oranžový WST-8 formazan. Množství tohoto formazanového barviva je přímo úměrné počtu metabolicky aktivních buněk.

Do připravených 24jamkových destiček pro daný den, bylo přidáno 1 ml 10% CCK-8 v DMEM s následnou inkubací po dobu 3 hodin při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo z každé jamky přepipetováno 200 µl media s CCK-8 do 96jamkové destičky. Takto připravená destička byla vložena do spektrofotometru, kde byla měřena absorbance 450nm záření.

### **7.8.2 Fluorescenční mikroskopie a počet buněk**

Každý testovací den byly vybrané vzorky opláchnuty fosfátovým pufrům (PBS) a vloženy na 15 minut do 1ml 2,5% glutaraldehydu v nové 24jamkové destičce pro fixaci buněk na nanovlákněné vrstvě. Před obarvením buněčných částí bylo nejprve nutné narušit buněčné stěny, aby mohla barviva pronikat k cytoskeletu a jádru. Toho bylo dosaženo permeabilizačním roztokem složeného z 10 ml PBS, 0,01 g bovinního sérového albuminu a 0,1 % Tritonu-X.

Buněčná jádra byla obarvena pomocí barviva DAPI (Sigma Aldrich, USA), kdy ke každému vybranému vzorku bylo přidáno barvicího roztoku 300 µl. Vzorky byly ponechány 5 minut v tmavém prostředí. Vedle buněčných jader, byly barveny i buněčné cytoskelety pomocí phalloidin-FITC (Sigma Aldrich, USA) barviva. Ke každému vzorku bylo přidáno 300 µl roztoku s barvivem. Vzorky byly ponechány v tmavém prostředí po dobu 30 minut. Po obarvení buněk byly vzorky v 24jamkových destičkách několikrát propláchnuty PBS a v čistém PBS uloženy zakryté alobalem do lednice.

Sledování buněčných jader, obarvených modře pomocí DAPI, a cytoskeletů, obarvených zeleně pomocí phalloidinu-FITC, probíhalo za použití fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse-Ti-E (Nikon Imaging, Česká republika).

### **7.8.3 Skenovací elektronová mikroskopie**

Pro sledování buněk kultivovaných na nanovlákněných vrstvách bylo použito nejprve PBS k oplachu vrstev od DMEM a následně 2,5% glutaraldehydu k fixaci buněk na vrstvách. K práci ve skenovacím elektronovém mikroskopu bylo nutno vzorky

dehydratovat, k čemuž posloužila ethanolová řada o koncentracích 60%, 70%, 80%, 90%, 96% a 100% ethanolu. V každé koncentraci ethanolu byly vzorky ponechány po dobu 5 minut a po dehydrataci 100% ethanolem byly vzorky ponechány na parafilmu k vysušení. Další postup práce se řídil dle popisu v kapitole 7.4 *Skenovací elektronová mikroskopie*.



## 8 Hodnocení výsledků

V této kapitole lze najít poznatky a výsledky z provedených pracovních postupů a testů. Grafy s výsledky byly generovány v programu GraphPad Prism 9 (Dotmatics, USA).

### 8.1 Elektrostatické zvlákňování

Na zařízení Nanospider™ typu NS 1WS500U (Elmarco, Česká republika) byly elektrostaticky zvlákňeny polymerní roztoky PCL, PVDF a PVA. Klimatické podmínky procesu zvlákňování byly regulovány přesně řízeným klimatizačním systémem NS AC150/1000/2000 (Elmarco, Česká republika). V Tabulce 1 a Tabulce 2 lze vidět parametry při zvlákňovacím procesu přípravy jednovrstvých, respektive dvouvrstvých nanovlákných vrstev.

Zvlákňování roztoku PCL v rozpouštědlovém systému chloroform:ethanol:kyselina octová bylo poměrně rychlé a bezproblémové pro obě varianty experimentálních materiálů.

Při prvních pokusech zvláknit roztok PVDF v rozpouštědlovém systému DMAC:aceton bylo zjištěno, že je lepší doplňovat zásobní cartridge zařízení Nanospider™ v menších objemech než je maximální kapacita zásobníku, protože roztok po době delší než 10 minut v klimatizovaném prostředí začal gelovatět a houstnout, což bylo příčinou značného zhoršení procesu zvlákňování. Zároveň proběhla optimalizace samotné přípravy roztoku, kdy při prvním pokusu byl připraven objem 200 ml do jedné zásobní nádoby. Po přidání acetonu do roztoku však za určitou dobu roztok taktéž začal houstnout a zhoršila se schopnost manipulace s ním. V dalších postupech byly tedy připravovány zvláště tři až čtyři roztoky, každý o hmotnosti 50 gramů a aceton byl do PVDF rozpuštěném v DMAC přidáván až těsně před využitím toho daného roztoku. Při přípravě jednovrstvého PVDF o plošné hmotnosti 30 g/m<sup>2</sup> byla použita rychlost odtahu 3 mm/s, která se jevila jako limitní s použitým zvlákňovacím zařízením. Proces výroby byl tedy velice pomalý. V krátkých časových úsecích podkladová netkaná textilie prokluzovala na válečcích odváděcího mechanismu, na což musel být kladen zřetel a celý proces musel být pečlivě hlídán.

Zvlákňování roztoku PVA rozpuštěného v destilované H<sub>2</sub>O probíhalo bez problémů, ačkoliv příprava vrstvy o plošné hmotnosti 15 g/m<sup>2</sup> probíhala rovněž velmi pomalu při rychlosti odtahu podkladové netkané textilie 5 mm/s.

Tabulka 1: Parametry zvláknování jednovrstvých materiálů

| Polymer   |             | PCL  | PVDF                           |
|---|-------------|--|--------------------------------|
| Rozpouštědlový systém                           |             | dichloroform:ethanol:kyselina octová (8:1:1) | dimethylacetamid: aceton (8:2) |
| Vzdálenost mezi elektrodami [mm]                |             | 170  | 175                            |
| Napětí [kV]                                     | Elektroda 1 | -10  | -10                            |
|   | Elektroda 2 | 40   | 50                             |
| Rychlost pohybu cartridge EMW [mm/s]            |             | 480  | 380                            |
| Rychlost převíjení podkladové textilie [mm/min] |             | 24   | 3                              |
| Průměr průvlaku [mm]                            |             | 0,6  | 0,7                            |
| Teplota [°C]                                    |             | 22   | 22                             |
| Relativní vlhkost vzduchu [%]                   |             | 50   | 15                             |
| Plošná hmotnost vrstvy [g/m <sup>2</sup> ]      |             | 30   | 30                             |

Tabulka 2: Parametry zvláknování dvojevrstvých materiálů

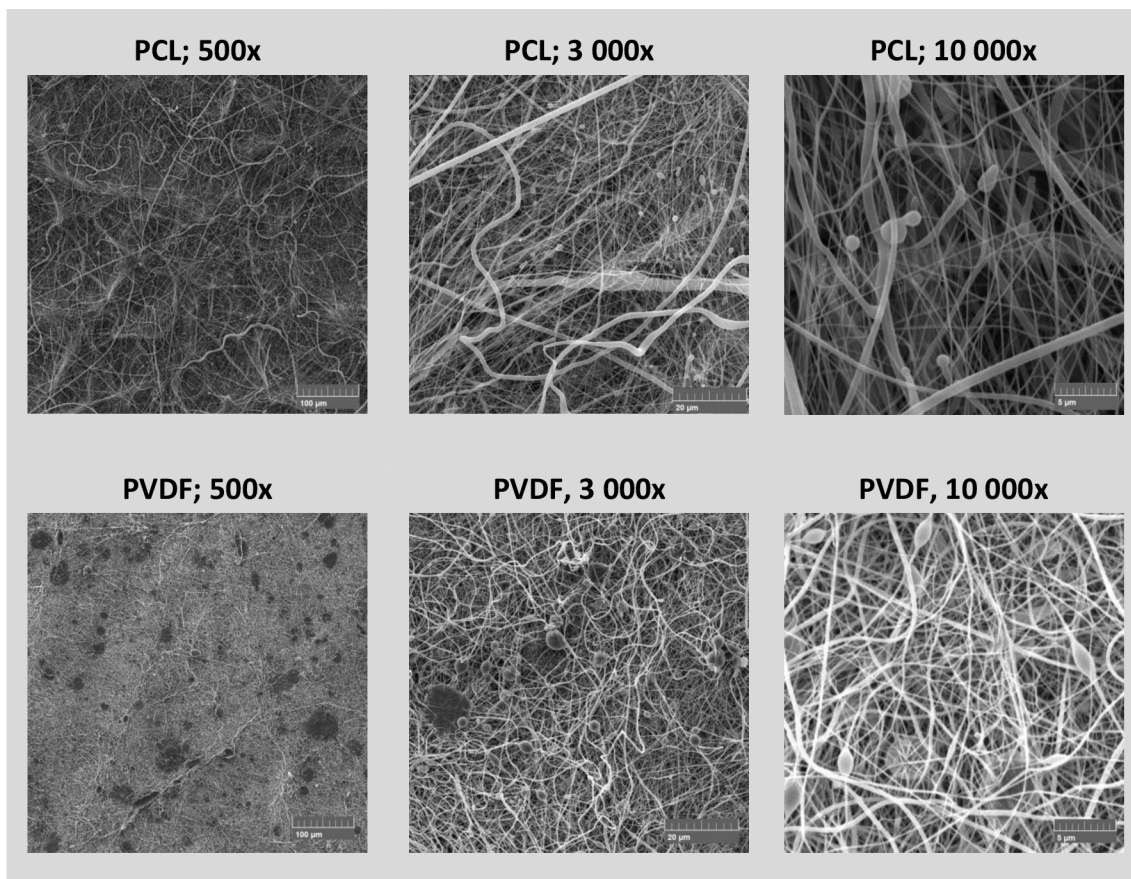
| Polymer   |             | PCL  | PVDF                           | PVA                          |
|---|-------------|--|--------------------------------|------------------------------|
| Rozpouštědlový systém                           |             | chloroform:ethanol:kyselina octová (8:1:1) | dimethylacetamid: aceton (8:2) | destilovaná H <sub>2</sub> O |
| Vzdálenost mezi elektrodami [mm]                |             | 170  | 175                            | 160                          |
| Napětí [kV]                                     | Elektroda 1 | -10  | -10                            | -5                           |
|   | Elektroda 2 | 40   | 50                             | 40                           |
| Rychlost pohybu cartridge EMW [mm/s]            |             | 400  | 380                            | 30                           |
| Rychlost převíjení podkladové textilie [mm/min] |             | 60   | 16                             | 5                            |
| Průměr průvlaku [mm]                            |             | 0,6  | 0,7                            | 0,6                          |
| Teplota [°C]                                    |             | 22   | 22                             | 22                           |
| Relativní vlhkost vzduchu [%]                   |             | 50   | 15                             | 62                           |
| Plošná hmotnost vrstvy [g/m <sup>2</sup> ]      |             | 15   | 15                             | 15                           |

## 8.2 Charakterizace vyrobených nanovláknenných vrstev

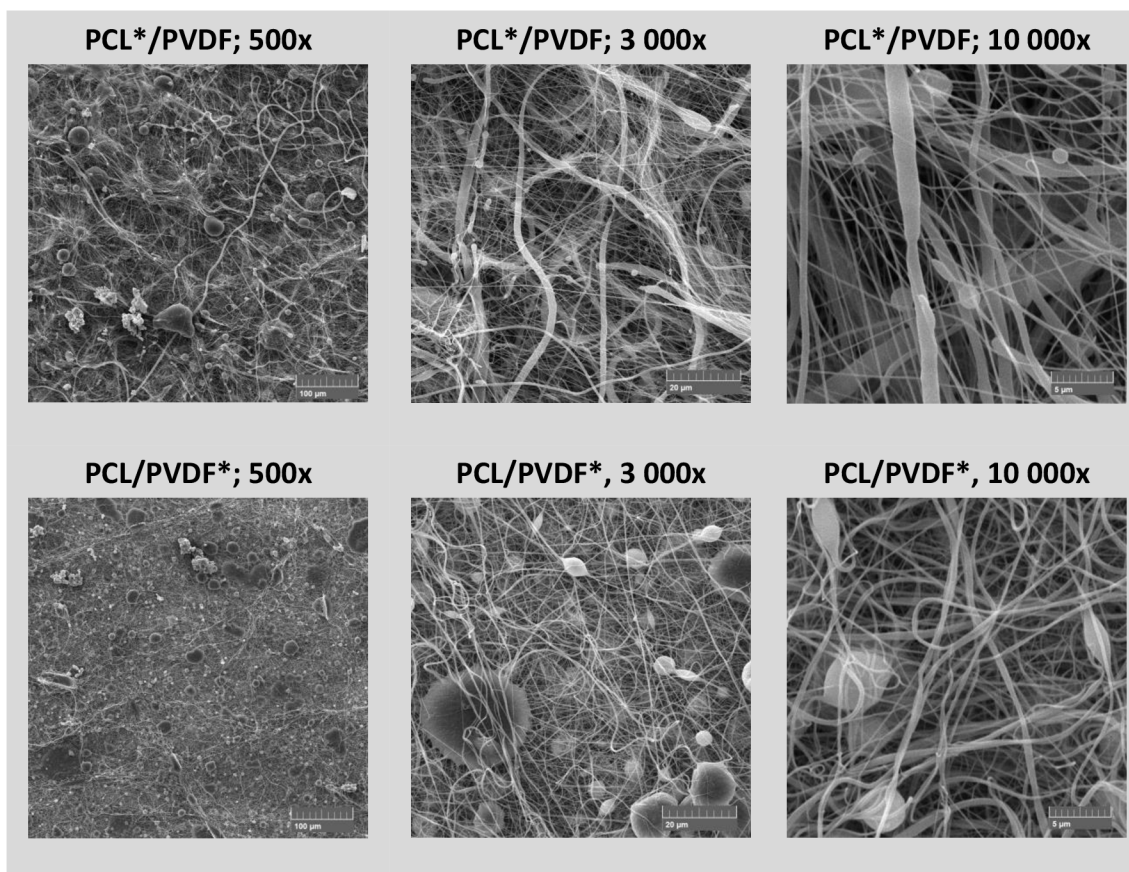
Procesem bezjehlového elektrostatického zvlákňování byly připraveny celkem čtyři materiály – jednovrstvy PCL a PVDF o plošných hmotnostech  $30 \text{ g/m}^2$  a dvojevrstvy PCL/PVDF a PVA/PVDF. Při jednotlivých měřeních je u dvojevrstev hvězdičkou (\*) označeno, která strana je zrovna popisována. Tedy, při označení PVA/PVDF\* je u této dvojevrstvy zrovna testována strana s nanovláknny PVDF.

### 8.2.1 Morfologie nanovláknenných vrtev

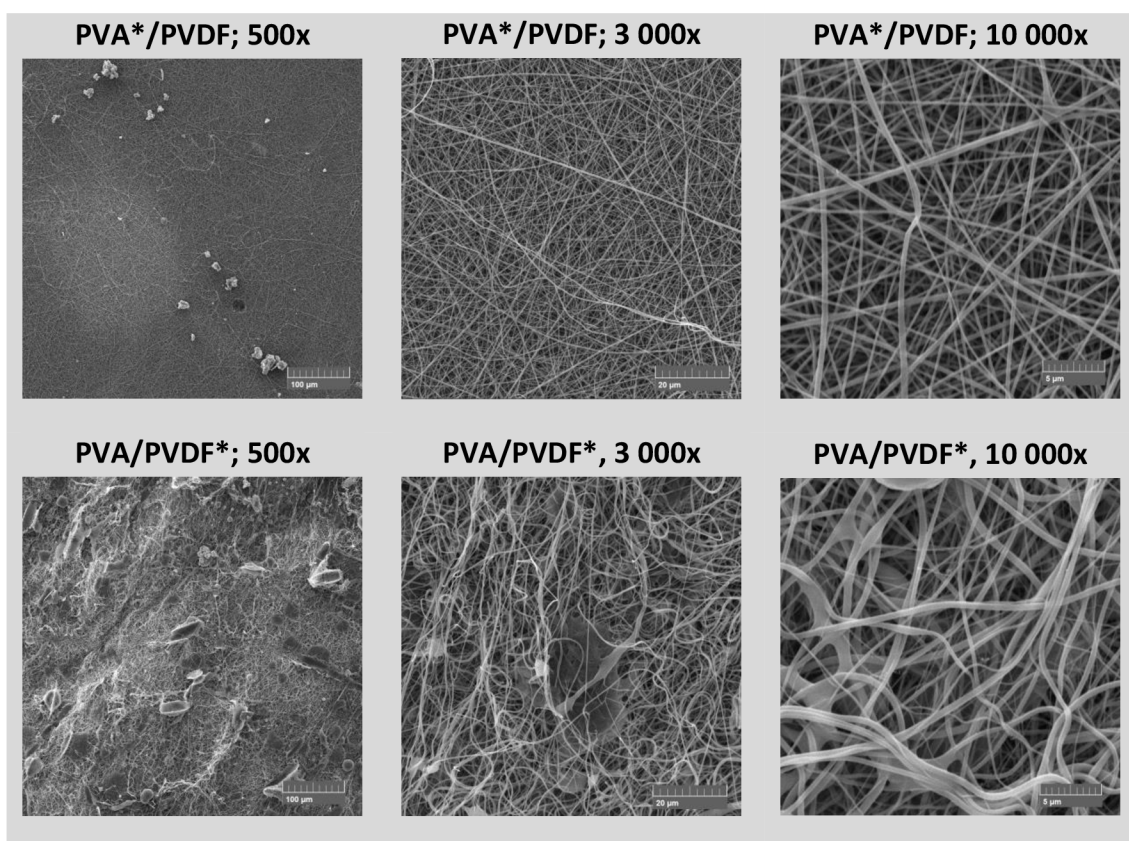
Na Obrázcích 13, 14 a 15 lze vidět morfologické snímky výsledných vrstev ( $30 \text{ g/m}^2$ ) ze skenovacího elektronového mikroskopu. Vlákna všech polymerů byla randomizovaně orientována. Vrstva nedegradabilního PVDF obsahuje patrné kapkovité defekty, které jsou typické pro bezjehlové elektrostatické zvlákňování tohoto polymeru.



Obrázek 13: SEM snímky připravených jednovrstev PCL a PVDF



*Obrázek 14: SEM snímky připravené dvojrstvy PCL/PVDF*



*Obrázek 15: SEM snímky připravené dvojrstvy PVA/PVDF*

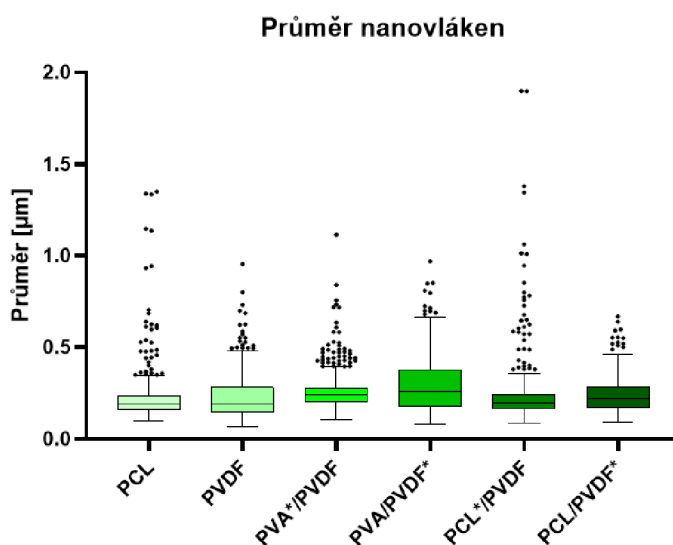
## 8.2.2 Průměr nanovláken

Pomocí analytického programu ImageJ bylo na snímcích ze SEM o zvětšení 5000x měřeno 500 průměrů vláken z každé materiálové vrstvy. V Tabulce 3 lze najít aritmetické průměry a směrodatné odchylky daných měření. Na Obrázku 16 je možné vidět grafické znázornění naměřených dat.

Největší průměrnou hodnotu naměřených dat mají nanovlákná PVDF na dvojvrstvě PVA/PVDF. Vzhledem k tomu, že vrstvy PVDF pro materiálové kombinace PCL/PVDF a PVA/PVDF byly zvláknovány první a za stejných podmínek, jedná se nejspíše o chybu měření při výběru jednotlivých vláken. Další možností je velká variabilita průměrů vláken díky defektním místům, která vznikají náhodně při zvláknování tohoto polymeru. Obecně se však průměrné hodnoty naměřených vláknenných průměrů pohybují v rozmezí od 200 nm do 300 nm.

Tabulka 3: Aritmetické průměry naměřených nanovláknenných průměrů a směrodatné odchylky

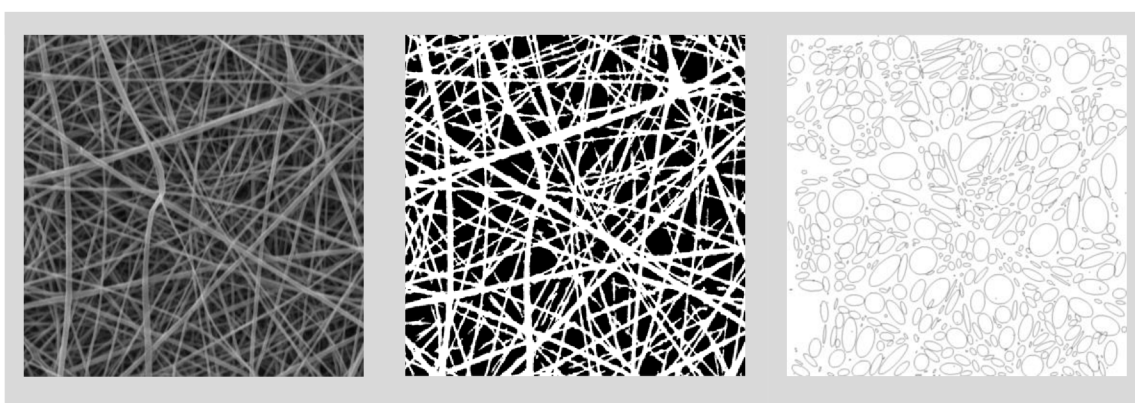
| Vrstva    | Průměr ± SD [nm] |
|-----------|------------------|
| PCL       | 224,41 ± 143,46  |
| PVDF      | 230,21 ± 121,45  |
| PVA*/PVDF | 261,17 ± 103,01  |
| PVA/PVDF* | 287,97 ± 145,36  |
| PCL*/PVDF | 238,88 ± 179,23  |
| PCL/PVDF* | 238,41 ± 93,75   |



Obrázek 16: Krabicové grafy naměřených průměrů vláken, Tukey; n=500

### 8.2.3 Porozita nanovláknenných vrstev

Porozita, neboli prostor nezaplňený vlákny, byla měřena pomocí analytického programu ImageJ. Snímky ze SEM pořízené při zvětšení 10000x bylo nutné transformovat prahováním na binární obraz. Na binárním obraze se pak vlákna jeví bíle, prázdné plochy černě. Dalším krokem bylo změření plochy zaujaté černými místy, k čemuž posloužilo vykreslení elips právě do těchto černých míst. Programem byla následně vypočítána procentuální část, kterou zaujímaly vnitřní plochy elips v celkové ploše snímku. Na Obrázku 17 lze ilustračně vidět původní SEM snímek vrstvy PVA\*/PVDF, binární obraz tohoto snímku a snímek vykreslených elips.



Obrázek 17: Zobrazení měření porozity PVA\*/PVDF nanovláknenné vrstvy; vlevo – původní SEM snímek, uprostřed – binární obraz SEM snímku, vpravo – snímek vykreslených elips

V Tabulce 4, která je uvedena níže, jsou zapsány naměřené hodnoty. Podle nich jsou nejvíce porézní vrstvy PVA\*/PVDF a PCL\*/PVDF. Nejméně porézní je jednovrstvý materiál z PVDF nanovláken. Výsledky jsou však jistě zkresleny celkovou metodikou a dají se brát spíše jen přibližně. Problémy u této metody hodnocení porozity jsou například subjektivita při tvorbě binárního obrazu a fakt, že elipsy nevyplňují prázdné prostory dokonale.

Tabulka 4: Hodnoty naměřené porozity vyrobených nanovláknenných vrstev v procentech

| Vrstva       | PCL    | PVDF   | PVA*/PVDF | PVA/PVDF* | PCL*/PVDF | PCL/PVDF* |
|--------------|--------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Porozita [%] | 38,860 | 26,201 | 45,192    | 36,217    | 42,274    | 33,980    |

### 8.2.4 Smáčivost nanovláknenných vrstev

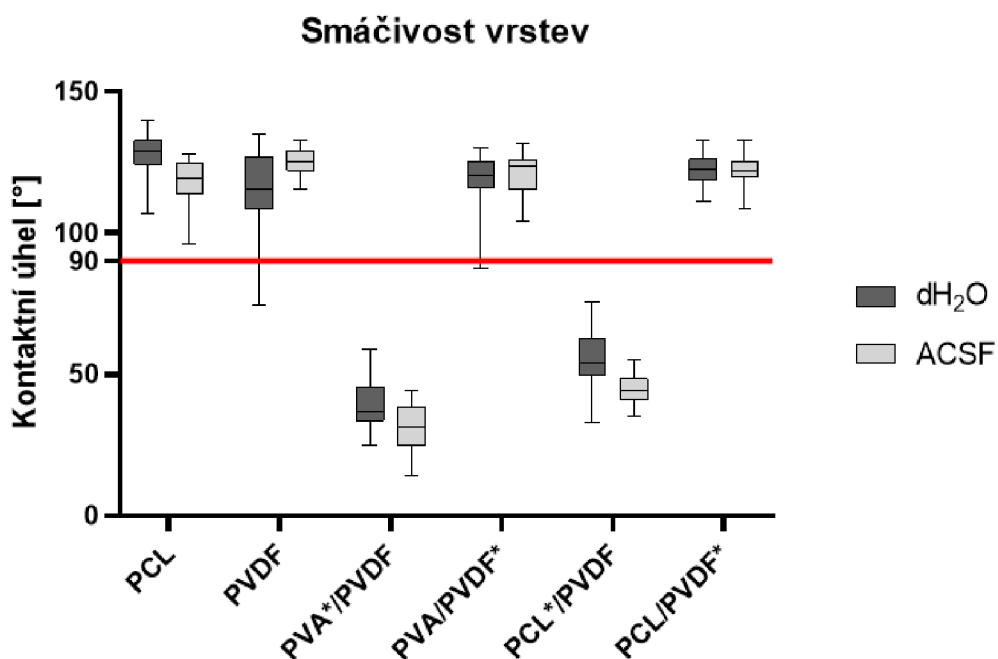
Smáčivost vyrobených nanovláknenných vrstev byla hodnocena metodou měření kontaktního úhlu s měřicí kapalinou. Každá z vrstev byla podrobena testu pomocí dH<sub>2</sub>O

a ACSF (Biochemazone Chemazone Inc., Kanada). Pokud je kontaktní úhel na rozhraní mezi kapalinou a pevnou látkou menší než 90°, je pevná látka považována za smáčivou. V případě kontaktního úhlu vyššího než 90°, je látka kapalinou nesmáčivá. Pro každou z vrstev bylo provedeno 30 měření.

Vrstvy PVDF byly v každém případě nesmáčivé, ať už se jednalo o jednovrstvu, nebo o dvojevrstvou variantu s jiným polymerním materiálem. Vrstva PVA byla velice dobře smáčena dH<sub>2</sub>O i ACSF. Jednovrstva PCL o plošné hmotnosti 30 g/m<sup>2</sup> byla oběma kapalinami nesmáčena, avšak u hmotnostní varianty 15 g/m<sup>2</sup> ve dvojevrstvé kombinaci s PVDF došlo k poměrně silnému smáčení dH<sub>2</sub>O i ACSF. Průměrné hodnoty kontaktních úhlů a směrodatných odchylek jsou k nalezení v Tabulce 5. Grafické znázornění naměřených hodnot je možné najít v Obrázku 18.

Tabulka 5: Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky naměřených kontaktních úhlů mezi testovanými nanovláčnými vrstvami a dH<sub>2</sub>O, resp. ACSF

| Testovací kapalina | PCL             | PVDF             | PVA*/PVDF      | PVA/PVDF*       | PCL*/PVDF      | PCL/PVDF*       |
|--------------------|-----------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| dH <sub>2</sub> O  | 126,98° ± 7,48° | 115,69° ± 13,46° | 39,24° ± 8,44° | 119,17° ± 8,54° | 55,31° ± 9,56° | 122,04° ± 4,95° |
| ACSF               | 118,23° ± 8,27° | 125,16° ± 4,63°  | 30,99° ± 7,75° | 120,45° ± 7,48° | 44,65° ± 4,48° | 122,27° ± 5,08° |



Obrázek 18: Krabicové grafy naměřených kontaktních úhlů, červená linie zobrazuje hranici ne-/smáčivosti 90°, Tukey; n=30

### 8.2.5 Adheze vláknenných vrstev na kolagenní vrstvu

Pro měření adhezní síly mezi vláknennými vrstvami a kolagenní vrstvou byla zvolena metoda peel testu. Nanovláknenné vrstvy byly nastříhány vždy do pěti vzorků o rozměrech 50x200 mm. Takto připravené vzorky byly následně kladeny a válečkem přitlačeny na připravenou kolagenní vrstvu. Pomocí laboratorního zařízení LabTest 4.050 pak byly naměřeny maximální adhezní síly mezi vrstvami kolagenu a nanovláken.

Vzhledem k použitému 5N siloměru a jeho 5% odchylkou se maximální hodnoty pod 0,025 N nedají považovat jako relevantní, protože mohly být způsobeny chybou měření. Proto valná většina dat musí být z hodnocení vyřazena a jediné relevantní hodnoty se objevují u měření s jednovrstvým PCL. Při měření PVA ve dvojrvtvě s PVDF sice jedna z maximálních hodnot přesáhla danou hranici 0,025 N, ostatní hodnoty jsou však od této naměřené síly poměrně vzdáleny a může se tedy jednat pouze významnější chybu měření. I u již zmíněného jednovrstvého PCL jsou hodnoty velmi blízko hranici a spolehlivost těchto výsledků by musela být ověřena citlivějším siloměrem. Všechny naměřené hodnoty jsou zaneseny v Tabulce 6.

*Tabulka 6: Jednotlivé naměřené maximální adhezní síly v Newtonech mezi kolagenovou a nanovláknennou vrstvou, červeně hodnoty pod hranicí spolehlivosti měřicího zařízení, zeleně hodnoty nad hranicí spolehlivosti měřicího zařízení*

| PCL     | PVDF    | PVA*/PVDF | PVA/PVDF* | PCL*/PVDF | PCL/PVDF* |
|---------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 0,017 N | 0,006 N | 0,042 N   | 0,013 N   | 0,008 N   | 0,012 N   |
| 0,029 N | 0,013 N | 0,020 N   | 0,004 N   | 0,017 N   | 0,008 N   |
| 0,041 N | 0,004 N | 0,009 N   | 0,014 N   | 0,012 N   | 0,012 N   |
| 0,021 N | 0,006 N | 0,012 N   | 0,013 N   | 0,008 N   | 0,014 N   |
| 0,030 N | 0,011 N | 0,013 N   | 0,012 N   | 0,009 N   | 0,010 N   |

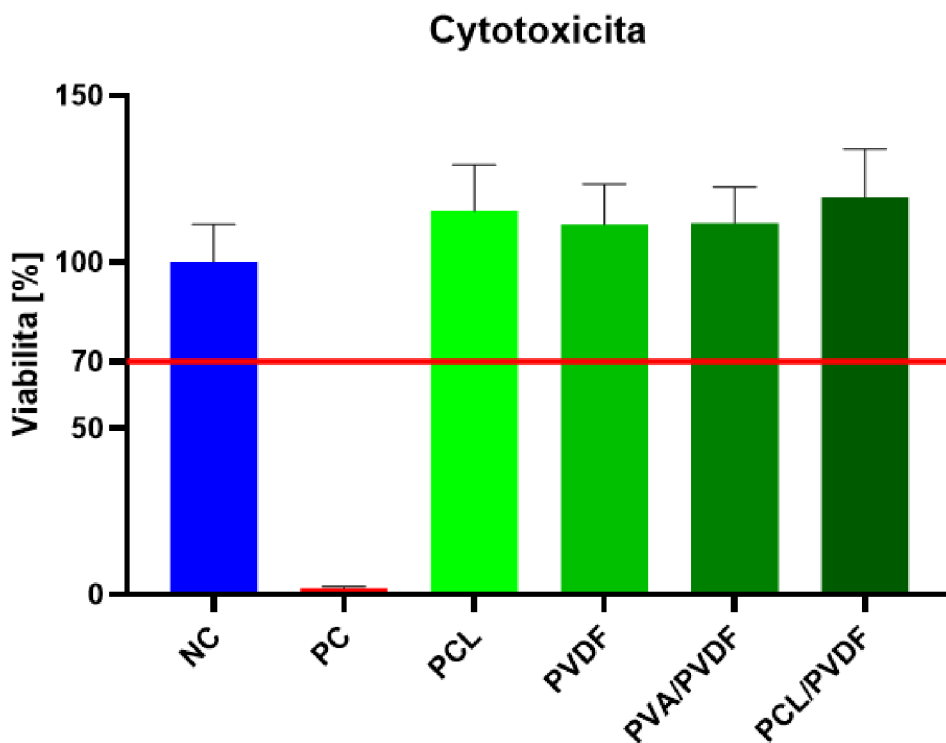
### 8.3 Cytotoxicita materiálových extraktů

Měření cytotoxicity je metodou, jejíž pomocí je možné určit, zda jsou materiály vůbec vhodné k buněčné kultivaci. Připravené materiálové extrakty byly přidány k linii buněk 3T3 myších rakovinových fibroblastů. Doba inkubace buněk s extrakty byla 24 hodin. Pomocí metabolického kalorimetrického testu MTT byla hodnocena viabilita buněk. Viabilitou je rozuměna schopnost daných buněk přežít v určitém prostředí a je zapisována v procentech. Hodnota viability 70 % je dle normy ČSN EN ISO 10993:5



brána jako hraniční a životaschopnost pod touto hranicí značí, že kultivační prostředí je pro buňky toxické.

Jako 100% hranice viability slouží vzorek negativní kontroly (NC), což jsou buňky v obyčejném médiu. Pozitivní kontrola (PC) jsou buňky v médiu usmrcené Tritonem-X. Všechny připravené materiály jsou, dle výsledku testu, pro buňky netoxické. Grafické znázornění viability buněk v jednotlivých extraktech je na Obrázku 19.



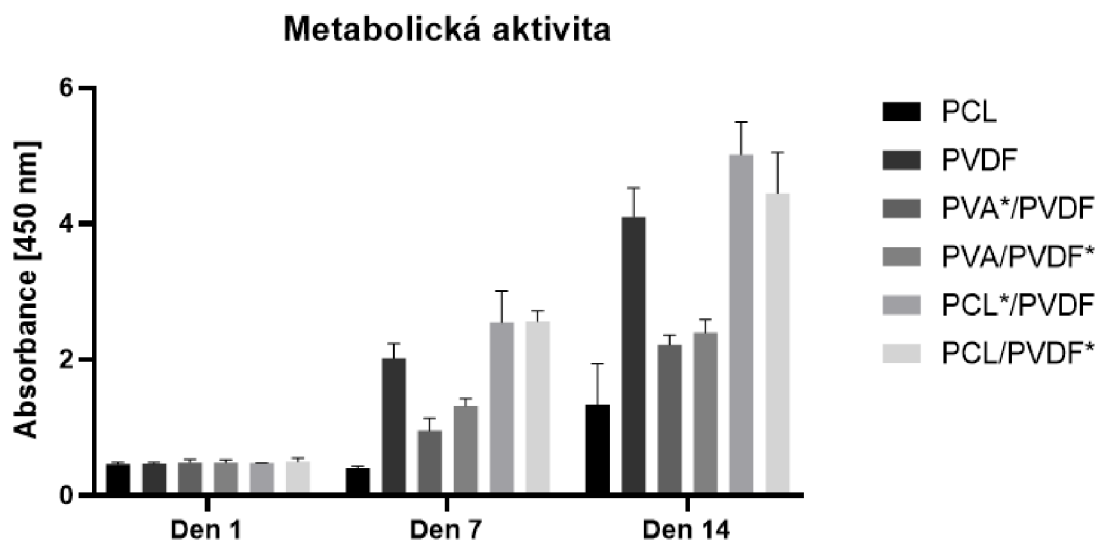
Obrázek 19: Viabilita pozitivní kontroly (PC), negativní kontroly (NC) a materiálových extraktů, červená linie zobrazuje 70% hranici viability dle ČSN EN ISO 10993:5,  $n=5$

#### 8.4 *In vitro* test buněčné adheze a proliferace

V rozmezí čtrnácti dnů byla sledována metabolická aktivita a počet 3T3 myších fibroblastů na nanovlákněných vrstvách. Hodnocení bylo provedeno po jednom, sedmi a čtrnácti dnech kultivace buněk na vrtvách.

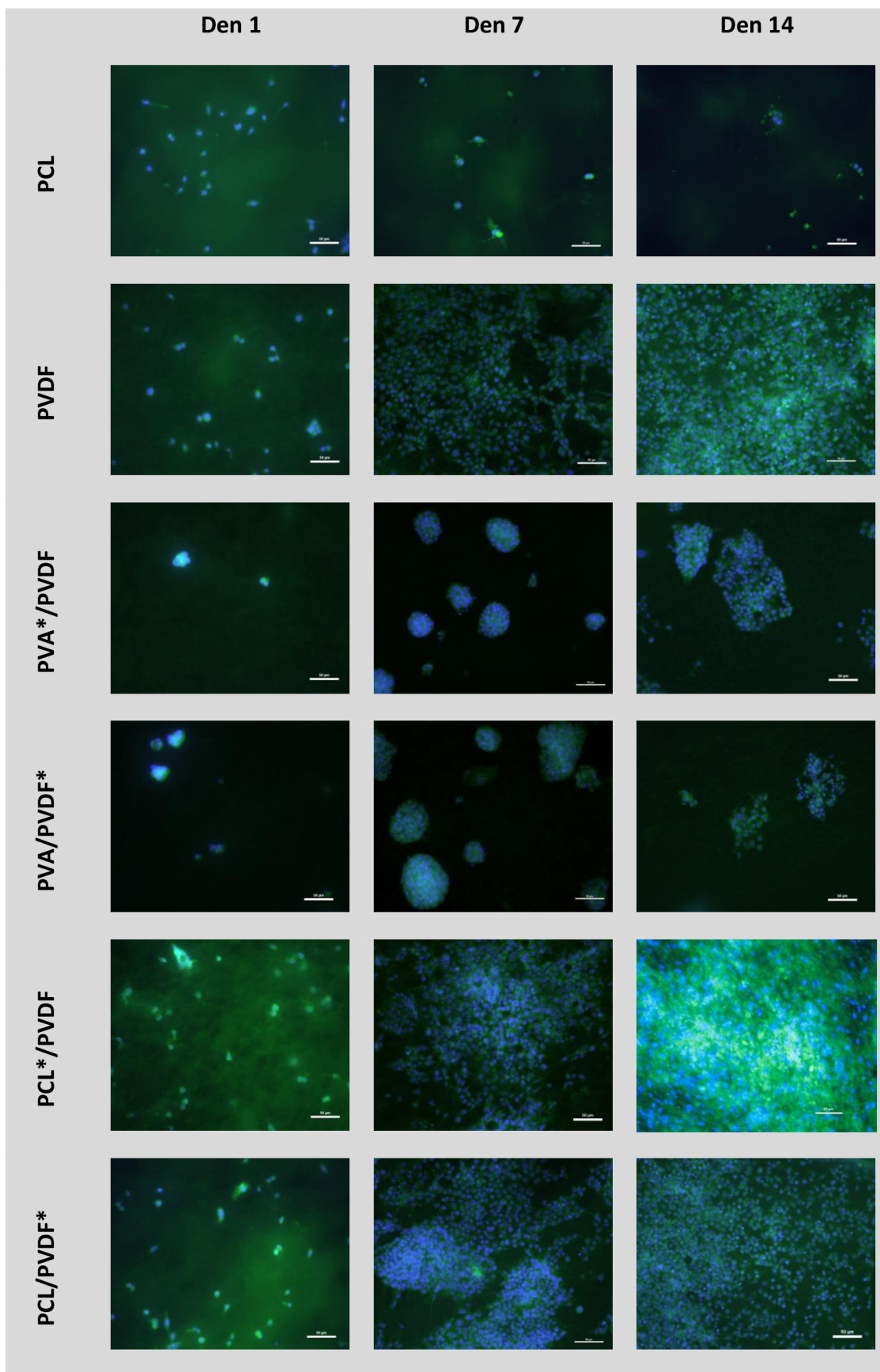
Metabolická aktivita byla hodnocena metabolickým CCK-8 testem a výsledky jsou zobrazeny jako absorbance elektromagnetického záření o vlnové délce 450 nm v Obrázku 20. Po jednom dni kultivace byla metabolická aktivita na všech testovaných vrstvách nízká, ale relativně stejná. První rozdíly se projevují po sedmi dnech buněčné

kultivace. Nejnižší aktivita, dokonce lehce nižší oproti dni jedna, byla naměřena na jednovrstvém PCL materiálu. Nejvyšší aktivita pak byla měřena na obou stranách dvojvrstvy PCL/PVDF. Velmi podobný trend lze vidět i po čtrnácti dnech kultivace. Jednovrstvý PCL materiál vykazoval nejnižší podporu buněčného růstu, dvojvrstva PCL/PVDF podporu nejvyšší.



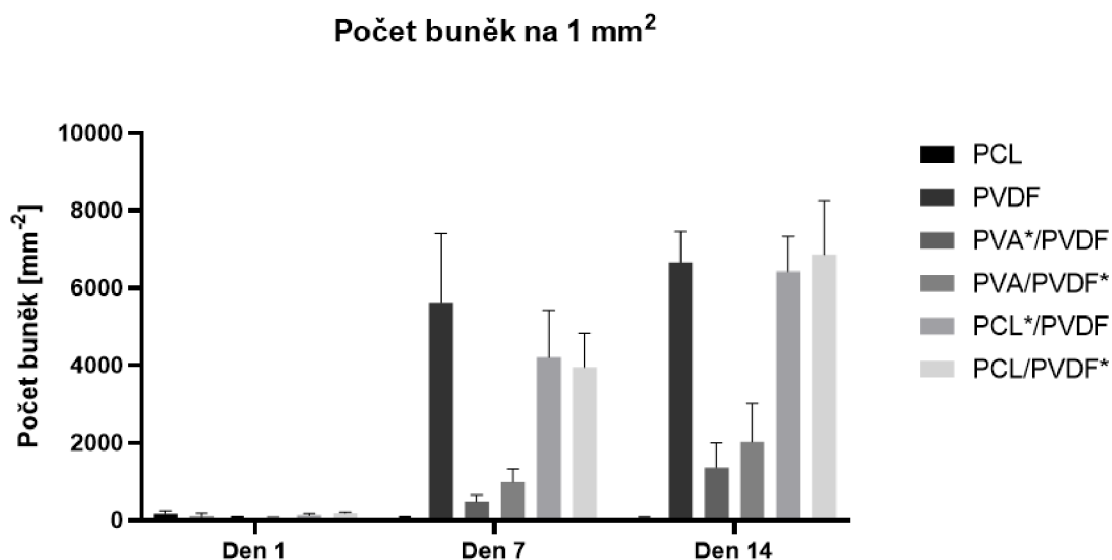
Obrázek 20: Metabolická aktivita buněk na nanovlákněných vrstvách po 1., 7. a 14. dni kultivace;  $n=5$

Počet buněk v jednotlivých testovacích dnech byl spočítán pomocí programu MatLab ze snímků buněk na nanovlákněných vrstvách pořízených fluorescenční mikroskopií. Snímky z fluorescenční mikroskopie s modře obarvenými buněčnými jádry a zeleně obarvenými cytoskelety lze vidět na Obrázku 21.



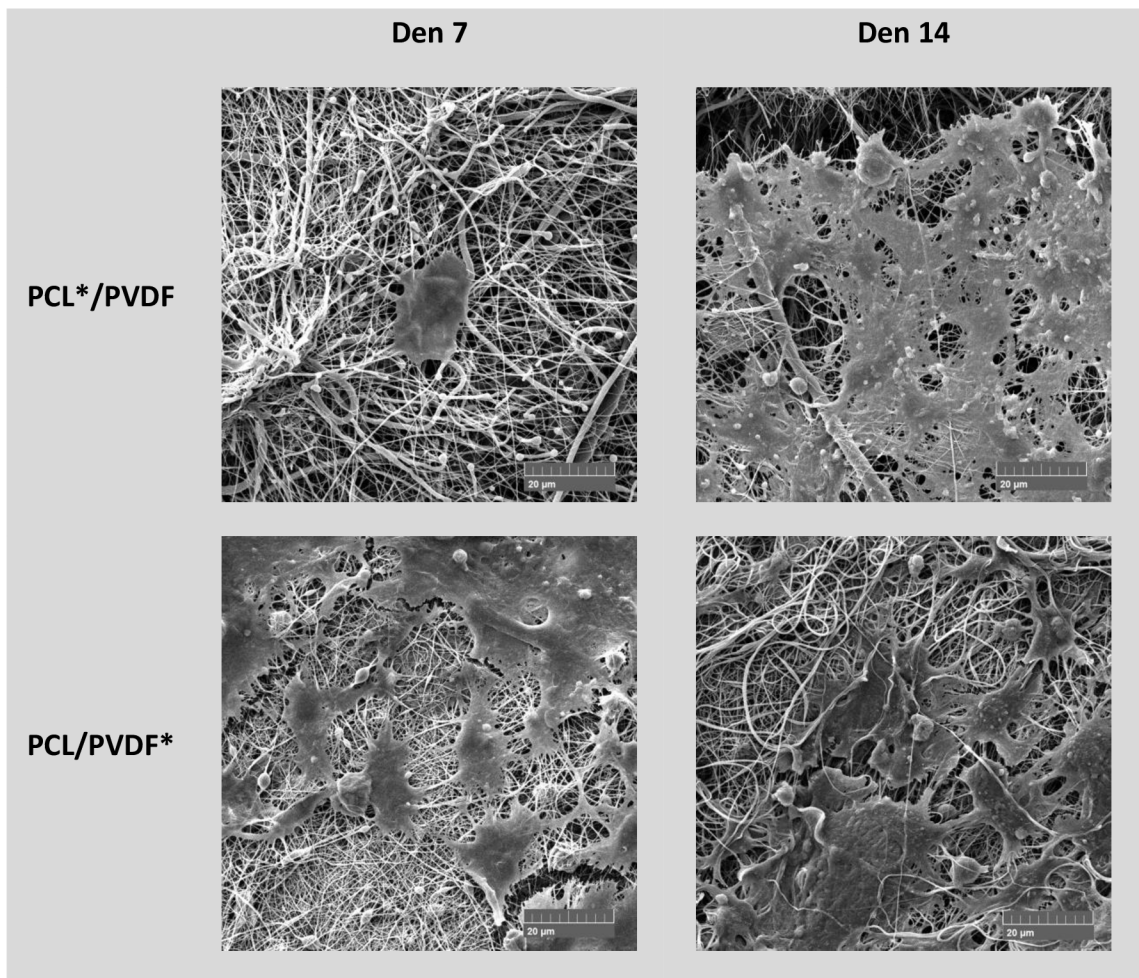
Obrázek 21: Snímky pořízené fluorescenčním mikroskopem s modře obarvenými buněčnými jádry a zeleně obarvenými buněčnými cytoskelety; měřítko 50  $\mu\text{m}$

Na Obrázku 22 je možné vidět zprůměrované hodnoty počtů buněk na nano-vlákenných vrstvách v jednotlivých testovacích dnech. Trend poměrně dobře kopíruje výsledky metabolického CCK-8 testu. Rozdílem proti výsledkům z metabolického CCK-8 testu je zřejmě vyšší buněčný počet 7. den testování u jednovrstvého PVDF.



Obrázek 22: Průměrný počet buněk na ploše materiálu 1 mm<sup>2</sup> po 1., 7. a 14. dni kultivace; n=10

Nanovlákenné vrstvy porostlé 3T3 myšimi fibroblasty byly také snímány pomocí SEM. Jako reprezentativní byly vybrány snímky obou stran dvojvrstvy PCL/PVDF ze sedmého a čtrnáctého dne testování, u kterých je z výsledků výše patrný silný trend růstu buněk. Vybrané snímky při zvětšení 3000x lze vidět v Obrázku 22.



*Obrázek 22: Snímky proliferace 3T3 myších fibroblastů nanovláčnými strukturami ze 7. a 14. dne sledování, pořízené SEM; zvětšení 3000x; měřítko 20 μm*

## 9 Diskuze výsledků

Výběr polymerů do této diplomové práce nebyl náhodný. Biodegradabilní PCL a PVA i nebiodegradabilní PVDF jsou hojně využívány a zkoumány v různých oblastech tkáňového inženýrství. Dvojvrstvá kombinace degradabilních PCL a PVA byla použita například v práci Klíčové (2020), kde byla ověřena schopnost buněk adherovat a proliferovat skrz takovýto dvojvrstvý materiál [6]. Polymer PVDF ve formě nanovláken byl využit Klápšťovou (2020) jako drenážní implantát pro léčbu očního glaukomu. Použitím PVDF bylo docíleno zamezení růstu buněk a fibrotizace tkáně v místě aplikace [36].

Bagherzadeh (2023) využil kombinaci nanovláken PCL a PVDF k tvorbě scaffoldu pro kostní regeneraci. Ve své práci zvlákněval polymery zvlášť i ve společné kombinaci z jednoho roztoku s různými poměry složek. Jako zvláknovací metodu použil jehlové elektrostatické zvláknování. Na závěr porovnával mimo jiné homogenitu vrstev i průměry vláken. Stejně jako v jeho výzkumu i v této diplomové práci byly vyrobeny homogenní nanovláknenné vrstvy s náhodnou orientací vláken. Dle výsledků Bagherzadecha měla v průměru jeho nanovláknena samostatně zvlákněvaného PCL průměry kolem 50-150 nm, u PVDF pak 250-350 nm [37]. V porovnání s těmito hodnotami jsou pak průměrné hodnoty nanovláknenných průměrů diplomové práce pro všechny zvlákněné vrstvy v rozmezí 200-300 nm. Data jsou velmi podobná i přes to, že byly použity rozdílné metodiky při zvláknování.

Při měření smáčivosti metodou kontaktního úhlu na přisedlé kapce byla ověřena nesmáčivost PVDF ve všech variantách. Naměřené kontaktní úhly s dH<sub>2</sub>O v průměru dosahovaly 115-122° a s ACSF rozmezí 120-125°. U PCL však došlo ke změně smáčivosti v závislosti na tom, zda byl samotný, nebo v kombinaci s PVDF. Jako samotný v jednovrstvé variantě dosáhl průměrné hodnoty 126,98° (± 7,48°) při měření dH<sub>2</sub>O a 118,23° (± 8,27°) s ACSF. Ve dvojvrstvé verzi v kombinaci s PVDF však výrazně vzrostla jeho ochota se smáčet oběma kapalinami s průměrnými kontaktními úhly 55,31° (± 9,56°) pro dH<sub>2</sub>O a 44,65° (± 4,48°) pro ACSF. Měřením kontaktního úhlu u PVA byla potvrzena je dobrá smáčivost s průměrnými úhly 39,24° (± 8,44°) pro dH<sub>2</sub>O, respektive 30,99° (± 7,75°) pro ACSF.

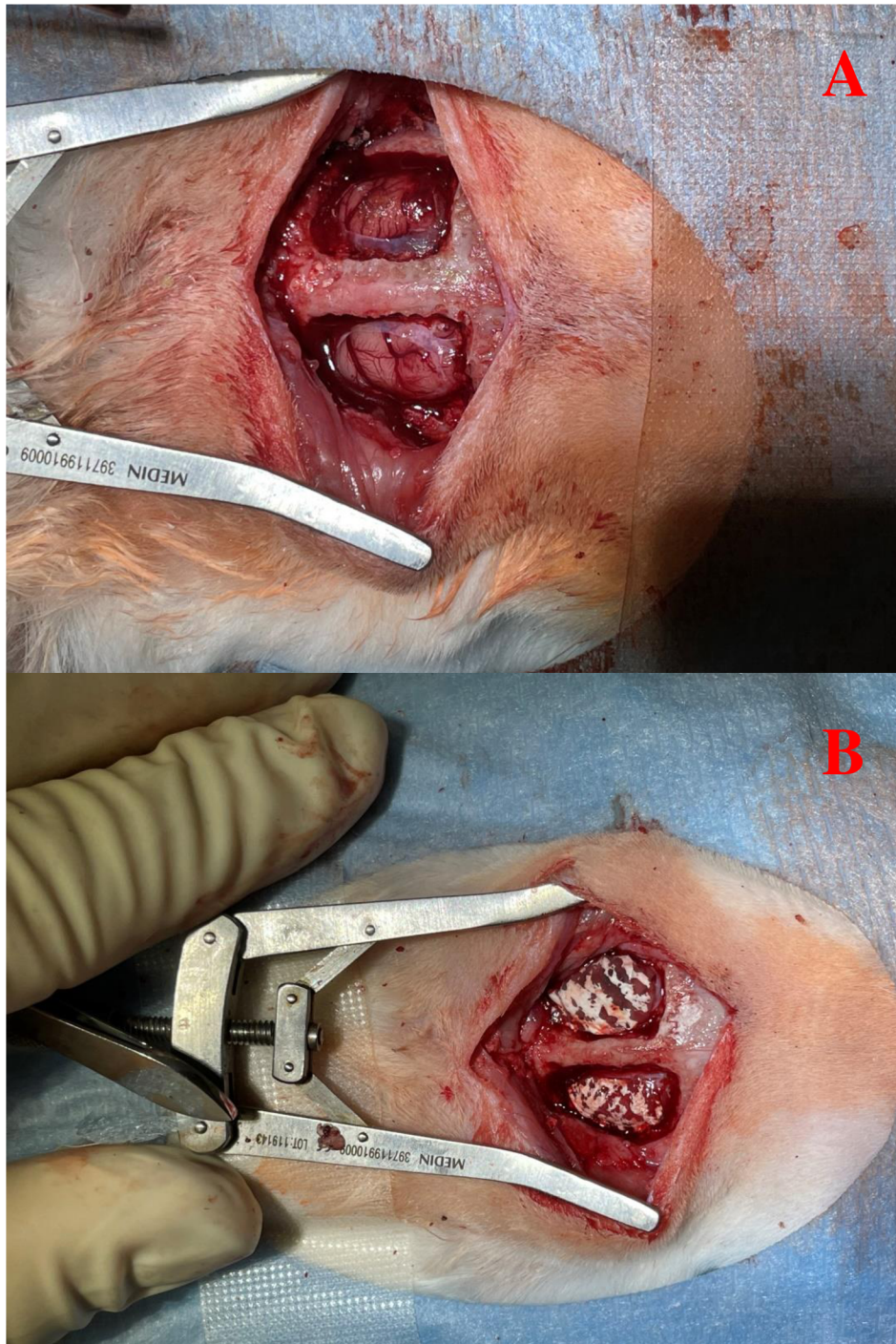
Měření adhezní síly mezi nanovláknennými vrstvami a kolagenní vrstvou, určenou původně pro potravinářský průmysl, nebylo příliš úspěšné. Převážná většina hodnot

byla naměřena pod hranicí spolehlivosti 5N siloměru. U PCL jsou sice 4 z 5 hodnot vyšší, ale i tak jsou poměrně blízko této hranici. Pokud by bylo zamýšleno měření opakovat, bylo by vhodné použít citlivější měřicí zařízení a případně diskutovat i použití skutečné dury.

Testováním cytotoxicity materiálových extraktů na 3T3 myších fibroblastech bylo ověřeno, že zvlákněné materiály je vhodné využít pro tkáňové scaffoldy podporující buněčný růst. Všechny čtyři materiály byly cytocompatibilní. To bylo následně potvrzeno i metabolickým testem CCK-8 pro test buněčné adheze a proliferace a počítáním buněk pomocí fluorescenční mikroskopie. Zde bylo v testovacím období 14 dnů zjištěno, že nejlepší podpůrné vlastnosti vykazuje jednovrstvý PVDF nanovláknenný materiál a dvojvrstva z PCL a PVDF. Jednovrstvé PCL bylo v měřeních nehorší, i když jistou podporu buněčné aktivity také poskytuje.

Při dalších pokusech by mohlo být otestováno různých plošných hmotností. Pokud by byla snížena požadovaná plošná hmotnost na  $20 \text{ g/m}^2$ , snížila by se časová náročnost na zvláknění nanovláknenných vrstev, zejména pak vrstvy PVDF. U té byl právě také problém s rychlostí odváděcího zařízení, kdy při odtahové rychlosti docházelo k pozastavování odtahu. Toto lze sice eliminovat rozdělením procesu na dvě zvláknění první vrstvy o poloviční plošné hmotnosti s následným povlákněním druhou vrstvou s tou samou plošnou hmotností, ale tento postup pak značně zvýší časovou náročnost. Dále je třeba možná inkorporace antibiotik pro prevenci bakteriálních infekcí.

Díky těmto, a mnoha dalším, z dřívějšíka ověřeným materiálovým znalostem byly právě PCL, PVA a PVDF vybrány MUDr. Pavlem Póczošem z neurochirurgické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Za úkol bylo vytvořit nanovláknenné vrstvy o plošné hmotnosti  $30 \text{ g/m}^2$  z materiálů, které budou podporovat novotvorbu a regeneraci dury mater, přičemž zároveň zamezí vzniku tkáňových srůstů mezi regenerující se durou a krycí měkkou tkání, případně samotným mozem. Forma materiálů jako nanovláken byla vybrána také z předpokladu snazší manipulace a suturace při neurochirurgickém zákroku. Snímky z *in vivo* implantace vyrobených materiálů lze spatřit na Obrázku 23.



*Obrázek 23: Fotografické snímky z chirurgické implantace jedné z vyrobených nanovláknenných vrstev; A – odhalená mozková tkáň, B – nanovláknenná vrstva po implantaci do lebeční dutiny [38]*



## Závěr

Cílem diplomové práce bylo vyvinout nanovláknenné jednovrstvy a dvojevrstvy z polymerů poly- $\epsilon$ -kaprolakton (PCL), polyvinyl alkohol (PVA) a polyvinyliden fluorid (PVDF) o plošné hmotnosti 30 g/m<sup>2</sup>. Tyto vrstvy jsou zamýšlené pro potřeby neurochirurgie, konkrétně jako náhrada dury mater a pro prevenci tkáňových srůstů mezi durou a okolními tkáněmi. Nahrazovat duru mater je potřeba v případě, že dojde k jejímu nevratnému poškození z důvodu silného zánětlivého onemocnění, fyzického traumatu v oblasti hlavy, nebo při náročnějších chirurgických zákrocích, kdy je nutné duru záměrně poškodit, či přímo odebrat. Tkáňové srůsty, jinak také adheze, pak vznikají díky zvýšené buněčné aktivitě v místě rány a tělo se ji snaží zahojit. Adheze následně mohou zapříčinit diskomfort pacienta a nutnost provést další chirurgický zákrok k odstranění adhezí.

Teoretická část diplomové práce popisuje princip bezjehlového elektrostatického zvlákňování, použité polymery a tkáňové inženýrství. Dále je zde i krátká rešerše na téma durálních náhrad a anti-adhezivních materiálů.

V experimentální části se nachází pracovní postupy, vyhodnocení výsledků a jejich diskuze. Byly tedy vytvořeny čtyři nanovláknenné materiály, specificky vybrané neurochirurgem z praxe. Konkrétně se jednalo o jednovrstvé nanovláknenné materiály z PCL, respektive PVDF a dvojevrstvé nanovláknenné materiály v kombinacích PCL/PVDF a PVA/PVDF. Pro výrobu těchto vrstev bylo použito zařízení Nanospider<sup>TM</sup> pro bezjehlové zvlákňování ze struny. Materiály následně byly pro další potřeby práce sterilizovány ethylenoxidem. Vrstvy byly dále pozorovány snímkovací elektronovou mikroskopií a na pořízených snímcích pak byly měřeny průměry nanovláken a také porozita. U nanovláknenných vrstev byla také ověřována jejich ne-/smáčivost destilovanou vodou a simulovaným mozkomíšním mokem. Byl proveden i pokus o měření adhezní síly peel testem mezi nanovláknennými vrstvami a kolagenní vrstvou. Tento pokus ovšem nebyl příliš úspěšný, když většina výsledku vyšla pod hladinou spolehlivosti měřicího zařízení. V případných dalších pokusech by tedy bylo vhodné použití citlivějšího siloměru. Materiálové extrakty v DMEM byly testovány na cytotoxicitu, tedy zda náhodou nebudou zabíjet nasazené buňky, metabolickým testem MTT. Jako buněčný materiál pro biologické testování byly zvoleny 3T3 myší fibroblasty. Po ověření, že materiály jsou cytokompatibilní byla testována adheze

a proliferace buněk na nanovlákných vrstvách. K tomu byl proveden metabolický test CCK-8 po jednom, sedmi a čtrnácti dnech inkubace buněk od jejich nasazení na vyrobené nanovlákné vrstvy. Spektrofotometrií vždy byla vyhodnocena absorbance, která odpovídá buněčné viabilitě, tedy životaschopnosti. Z každého dne sledování byly také připraveny vzorky pro sledování buněčné proliferace vrstvami pomocí skenovací elektronové mikroskopie a mikroskopie fluorescenční.

Z výsledků biologických měření vyplývá, že vybrané a vyrobené nanovlákné vrstvy splňují požadavky pro využití v tkáňovém inženýrství. Část vyrobených vzorků byla také předána do medicínské praxe a implantována do lebeční dutiny pro testování materiálů *in vivo*. V této chvíli však ještě nejsou výsledky zveřejněny.

## Lietratura

- [1] ŞAFAK, Şerife, Esra KARACA a Gözde ÖZALP. *Cerrahi Adezyonun Önlenmesi için Yeni Bir Yaklaşım: Nanolifli Cerrahi Adezyon Bariyerleri*. Tekstil ve Mühendis [online]. 2017, vol. 24, s. 111-123 [cit. 2020-12-10]. ISSN 13007599. DOI:10.7216/1300759920172410608
- [2] WU, Wei, Ruoyu CHENG, José DAS NEVES, Jinecheng TANG, Junyuan XIAO, Qing NI, Xinnong LIU, Guoqing PAN, Dechun LI, Wenguo CUI a Bruno SACRAMENTO. *Advances in biomaterials for preventing tissue adhesion*. Journal of Controlled Release [online]. 2017, vol. 261, s. 318-336 [cit. 2020-12-10]. ISSN 01683659. DOI:10.1016/j.jconrel.2017.06.020
- [3] MACEWAN, Matthew R., Tamas KOVACS, Joshua OSBUN a Wilson Z. RAY. *Comparative analysis of a fully-synthetic nanofabricated dura substitute and bovine collagen dura substitute in a large animal model of dural repair*. Interdisciplinary Neurosurgery [online]. 2018, 13, 145-150 [cit. 2022-04-27]. ISSN 22147519. DOI: 10.1016/j.inat.2018.05.001
- [4] VASITA, Rajesh a Dhirendra S KATTI. *Nanofibers and their applications in tissue engineering*. International Journal of Nanomedicine [online]. 2006, vol. 1, s. 15-30 [cit. 2020-12-10]. ISSN 1176-9114. DOI:10.2147/nano.2006.1.1.15
- [5] PETRÁŠ, David, Dušan KIMMER, Karel SOUKUP a Petr KLUSOŇ. *Bezpečná nanovlákná*. Chemické listy [online]. 2009, vol. 103, s. 1009-1016 [cit. 2020-12-10]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1425/1425>
- [6] KLICOVA, Marketa, Andrea KLAPSTOVA, Jiri CHVOJKA, Barbora KOPRIVOVA, Vera JENCOVA a Jana HORAKOVA. *Novel double-layered planar scaffold combining electrospun PCL fibers and PVA hydrogels with high shape integrity and water stability*. Materials Letters [online]. 2020, vol. 263 [cit. 2020-12-10]. ISSN 0167577X. DOI:10.1016/j.matlet.2019.127281
- [7] RAMAKRISHNA, S., K. FUJIHARA, W.-E. TEO, T.-CH. LIM a Z. MA. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. New Jersey: World Scientific, 2005, 396 s. ISBN ISBN 981-256-454-3

- [8] SARKAR, K., C. GOMEZ, S. ZAMBRANO, M. RAMIREZ, E. DE HOYOS, H. VASQUEZ a K. LOZANO. *Electrospinning to Forcespinning™*. *Materials Today*. 2010, 13(11), 12-14. DOI: 10.1016/S1369-7021(10)70199-1
- [9] ENGSTRÖM, J., HAGSTRÖM, B. *Centrifugal spinning of nanofiber webs – A parameter study of a novel spinning process*. *The Nordic Textile Journal*, 2009, p. 82–91
- [10] HAJIALI, Faezeh, Saeid TAJBAKHSH a Akbar SHOJAEI. *Fabrication and Properties of Polycaprolactone Composites Containing Calcium Phosphate-Based Ceramics and Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering*. *Polymer Reviews* [online]. 2017, **58**(1), 164-207 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1558-3724. DOI:10.1080/15583724.2017.1332640
- [11] *Polycaprolactone*. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2023-05-26]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Polycaprolactone>
- [12] TANG, Xiaozhi a Sajid ALAVI. *Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability*. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **85**(1), 7-16 [cit. 2023-05-26]. ISSN 01448617. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.01.030
- [13] BAKER, Maribel I., Steven P. WALSH, Zvi SCHWARTZ a Barbara D. BOYAN. *A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2012, **100B**(5), 1451-1457 [cit. 2023-05-26]. ISSN 15524973. DOI:10.1002/jbm.b.32694
- [14] Polyvinyl alcohol. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2023-05-26]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Polyvinyl\\_alcohol](https://en.wikipedia.org/wiki/Polyvinyl_alcohol)
- [15] HOLLINSKY, C. *Biomaterials for Hernia Repair*. In: *Comprehensive Biomaterials* [online]. Elsevier, 2011, 2011, s. 593-604 [cit. 2023-05-26]. ISBN 9780080552941. DOI:10.1016/B978-0-08-055294-1.00247-6

- [16] Polyvinylidene fluoride. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2023-05-26]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Polyvinylidene\\_fluoride](https://en.wikipedia.org/wiki/Polyvinylidene_fluoride)
- [17] LANZA, R., R. LANGER, J. P. VACANTI a A. ATALA. *Principles of Tissue Engineering*. 5. London: Academic Press, 2020. ISBN 978-0-12-818422-6
- [18] ASADIAN, M., K. V. CHAN, M. NOROUZI, S. GRANDE, P. COOLS, R. MORENT a N. DE GEYTER. *Fabrication and Plasma Modification of Nanofibrous Tissue Engineering Scaffolds*. *Nanomaterials*. 2020, 10(1), 119. DOI: 10.3390/nano10010119
- [19] RAMPICHOVA, S., M. BUZGO, J. CHVOJKA, E. PROSECKÁ, O. KOFROŇOVÁ a E. AMLER. *Cell penetration to nanofibrous scaffolds*. *Cell Adhesion & Migration*. 2014, 8(1), 36-41. DOI: 10.4161/cam.27477
- [20] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-5636-3.
- [21] ŠTEFÁNEK, Jiří. *Krvácení do mozku*. In: *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. 2011 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/krvaceni-do-mozku>
- [22] VELNAR, Tomaz a Lidija GRADISNIK. *Soft tissue grafts for dural reconstruction after meningioma surgery*. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* [online]. 2019 [cit. 2022-04-27]. ISSN 1840-4812. DOI:10.17305/bjbms.2019.3949
- [23] DANILOVA, D.A., L.I. GORBUNOVA, S.N. TSYBUSOV, I.V. USPENSKY a L.Ya. KRAVETS. *Materials for Plastic Surgery of the Dura Mater: History and Current State of the Problem (Review)*. *Sovremennye tehnologii v medicine* [online]. 2018, 10(3) [cit. 2022-04-27]. ISSN 20764243. DOI:10.17691/stm2018.10.3.24
- [24] Durepair regeneration matrix. *Medtronic* [online]. [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.medtronic.com/us-en/healthcare-professionals/products/neurological/cranialrepair/durepair-dura-regeneration-matrix.html>

- [25] DuraGen Plus. *Integra* [online]. [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.integralife.com/duragen-plus/product/dural-repair-grafts-duragen-plus>
- [26] Tissue-guard family. *Baxter: Advanced surgery* [online]. [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://globaladvancedsurgery.baxter.com/tissue-guard-family>
- [27] Hypro-sorb O. *Bioimplon: Biotech Innovation Pioneers* [online]. [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.bioimplon.de/hypro-sorb-o/?lang=en>
- [28] Lyoplant. *B. Braun: Sharing expertise* [online]. [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.bbraun.com/en/products/b0/lyoplant.html> 9
- [29] ПРИРОДНАЯ ЗАЩИТА МОЗГА. *Cardioplant* [online]. [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://cardioplant.ru/neurosurgery/xenodura>
- [30] Gore Preclude. *Gore medical* [online]. [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: <https://www.goremedical.com/products/precludepericardial>
- [31] Neuro-Patch. *B. Braun: Sharing expertise* [online]. [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: <https://www.bbraun.com/en/products/b1/neuro-patch.html>
- [32] DINARVAND, Peyman, Seyed Mahmoud HASHEMI, Ehsan SEYEDJAFARI, Iman SHABANI, Abdollah MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, Shirin FARHADIAN a Masoud SOLEIMANI. *Function of Poly (lactic-co-glycolic acid) Nanofiber in Reduction of Adhesion Bands*. *Journal of Surgical Research* [online]. 2012, vol. 172, s. e1-e9 [cit. 2020-12-10]. ISSN 00224804. DOI:10.1016/j.jss.2011.10.014
- [33] NASAJPOUR, Amir, Serena MANDLA, Sindu SHREE, Ebrahim MOSTAFAVI, Roholah SHARIFI, Akbar KHALILPOUR, Saghi SAGHAZADEH, Shabir HASSAN, Michael J. MITCHELL, Jeroen LEIJTEN, Xu HOU, Alireza MOSHAVERINIA, Nasim ANNABI, Rainer ADELUNG, Yogendra Kumar MISHRA, Su Ryon SHIN, Ali TAMAYOL a Ali KHADEMHOSEINI. *Nanostructured Fibrous Membranes with Rose Spike-Like Architecture*. *Nano Letters* [online]. 2017, vol. 17, s. 6235-6240 [cit. 2020-12-11]. ISSN 1530- 6984. DOI:10.1021/acs.nanolett.7b02929

- [34] SAKAI, Shinji, Kohei UEDA a Masahito TAYA. *Peritoneal adhesion prevention by a biodegradable hyaluronic acid-based hydrogel formed in situ through a cascade enzyme reaction initiated by contact with body fluid on tissue surfaces*. Acta Biomaterialia [online]. 2015, vol. 24, s. 152-158 [cit. 2020-12-11]. ISSN 17427061. DOI:10.1016/j.actbio.2015.06.023
- [35] YANG, Yunlong, Xiaolin LIU, Yan LI, Yang WANG, Chunyan BAO, Yunfeng CHEN, Qiuning LIN a Linyong ZHU. *A postoperative anti-adhesion barrier based on photoinduced imine-crosslinking hydrogel with tissue-adhesive ability*. Acta Biomaterialia [online]. 2017, vol. 62, s. 199-209 [cit. 2020-12-11]. ISSN 17427061. DOI:10.1016/j.actbio.2017.08.047
- [36] K LAPSTOVA, Andrea, Jana HORAKOVA, Maros TUNAK, Andrii SHYNKARENKO, Jakub ERBEN, Jana HLAVATA, Petr BULIR a Jiri CHVOJKA. *A PVDF electrospun antifibrotic composite for use as a glaucoma drainage implant*. Materials Science and Engineering: C [online]. 2021, **119** [cit. 2023-05-29]. ISSN 09284931. DOI:10.1016/j.msec.2020.111637
- [37] BAGHERZADEH, Elham, Zahra SHERAFAT, Seyed Mojtaba ZEBARJAD, Azin KHODAEI a Saber AMIN YAVARI. *Stimuli-responsive piezoelectricity in electrospun polycaprolactone (PCL)/Polyvinylidene fluoride (PVDF) fibrous scaffolds for bone regeneration*. Journal of Materials Research and Technology [online]. 2023, **23**, 379-390 [cit. 2023-05-29]. ISSN 22387854. DOI:10.1016/j.jmrt.2023.01.007
- [38] MUDr. Pavel Póčkoš PhD.; Neurochirurgická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové

## Seznam obrázků

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Obrázek 1: Schéma bezjehlového electrospinningu ze struny [6].....</i>   | <i>12</i> |
| <i>Obrázek 2: Strukturální vzorec poly-ε-kaprolaktonu [11].....</i>   | <i>14</i> |
| <i>Obrázek 3: Strukturální vzorec polyvinyl alkoholu [14].....</i>  | <i>15</i> |
| <i>Obrázek 4: Strukturální vzorec polyvinylidenfluoridu [16].....</i>   | <i>15</i> |
| <i>Obrázek 5: Zjednodušený princip tkáňového inženýrství. 1 - pacient, 2 - izolace buněk, 3 - buněčná expanze, 4 - 3D scaffold, 5 - tkáňový vývoj, 6 - růstové faktory, 7 - buňky, 8 - implantace [18].....</i>   | <i>16</i> |
| <i>Obrázek 6: Ilustrační zobrazení aplikačních oblastí biomateriálů v regenerativní medicíně (a, b, c – šlachová adheze; d, e, f – perikardiální adheze; g, h – adheze v dutině břišní; i, j – epidurální adheze; k, l, m, n – nitroděložní adheze) [20].....</i> | <i>18</i> |
| <i>Obrázek 7: Schéma výřezu lebeční dutiny se znázorněnými mozkovými pleny [21]...19</i>  |           |
| <i>Obrázek 8: Ilustrační snímek produktu Xenodura společnosti Cardiopiant [29].....</i>   | <i>21</i> |
| <i>Obrázek 9: Ilustrační snímek produktu Neuro-Patch společnosti B. Braun [31].....</i>   | <i>22</i> |
| <i>Obrázek 10: Implantované durální náhrady (A – syntetická nanovrstva Cerafix; B – kolagenní náhrada DuraMatrix) [3].....</i>  | <i>23</i> |
| <i>Obrázek 11: Snímek z elektronového mikroskopu ukazující strukturu kompozitu nanočástic oxidu zinečnatého a PCL nanovláken [33].....</i>  | <i>24</i> |
| <i>Obrázek 12: Testovací uspořádání s nanovláknennou vrstvou upnutou v čelisti trhacího zařízení na kolagenní vrstvě.....</i>   | <i>29</i> |
| <i>Obrázek 13: SEM snímky připravených jednovrstev PCL a PVDF.....</i>  | <i>35</i> |
| <i>Obrázek 14: SEM snímky připravené dvojvrstvy PCL/PVDF.....</i>   | <i>36</i> |
| <i>Obrázek 15: SEM snímky připravené dvojvrstvy PVA/PVDF.....</i>   | <i>36</i> |
| <i>Obrázek 16: Krabicové grafy naměřených průměrů vláken, Tukey; n=500.....</i>   | <i>37</i> |
| <i>Obrázek 17: Zobrazení měření porozity PVA*/PVDF nanovláknenné vrstvy; vlevo – původní SEM snímek, uprostřed – binární obraz SEM snímku, vpravo – snímek vykreslených elips.....</i>  | <i>38</i> |
| <i>Obrázek 18: Krabicové grafy naměřených kontaktních úhlů, červená linie zobrazuje hranici ne-/smáčivosti 90°, Tukey; n=30.....</i>  | <i>39</i> |



|  |           |
|--|-----------|
| <i>Obrázek 19: Viabilita pozitivní kontroly (PC), negativní kontroly (NC) a materiálových extraktů, červená linie zobrazuje 70% hranici viability dle ČSN EN ISO 10993:5, n=5.....</i>             | <i>41</i> |
| <i>Obrázek 20: Metabolická aktivita buněk na nanovlákných vrstvách po 1., 7. a 14. dni kultivace; n=5.....</i>   | <i>42</i> |
| <i>Obrázek 21: Snímky pořízené fluorescenčním mikroskopem s modře obarvenými buněčnými jádry a zeleně obarvenými buněčnými cytoskelety; měřítko 50 μm.....</i>                                     | <i>43</i> |
| <i>Obrázek 22: Průměrný počet buněk na ploše materiálu 1 mm<sup>2</sup> po 1., 7. a 14. dni kultivace; n=10.....</i>   | <i>44</i> |
| <i>Obrázek 22: Snímky proliferace 3T3 myších fibroblastů nanovláknými strukturami ze 7. a 14. dne sledování, pořízené SEM; zvětšení 3000x; měřítko 20 μm.....</i>                                  | <i>45</i> |
| <i>Obrázek 23: Fotografické snímky z chirurgické implantace jedné z vyrobených nanovlákných vrstev; A – odhalená mozková tkáň, B – nanovlákná vrstva po implantaci do lebeční dutiny [38].....</i> | <i>48</i> |

## Seznam tabulek

|  |    |
|--|----|
| <i>Tabulka 1: Parametry zvlákňování jednovrstvých materiálů</i> .....  | 34 |
| <i>Tabulka 2: Parametry zvlákňování dvojevrstvých materiálů</i> .....  | 34 |
| <i>Tabulka 3: Aritmetické průměry naměřených nanovlákných průměrů a směrodatné odchylky</i> .....  | 37 |
| <i>Tabulka 4: Hodnoty naměřené porozity vyrobených nanovlákných vrstev v procentech</i> .....  | 38 |
| <i>Tabulka 5: Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky naměřených kontaktních úhlů mezi testovanými nanovláknými vrstvami a dH<sub>2</sub>O, resp. ACSF</i> .....  | 39 |
| <i>Tabulka 6: Jednotlivé naměřené maximální adhezni síly v Newtonech mezi kolagenovou a nanovláknou vrstvou, červeně hodnoty pod hranicí spolehlivosti měřicího zařízení, zeleně hodnoty nad hranicí spolehlivosti měřicího zařízení</i> ..... | 40 |