



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI  
Fakulta mechatroniky, informatiky  
a mezioborových studií ■

# Tkáňové nosiče pro cévní náhrady připravené technologii střídavého elektrického zvlákňování

## Diplomová práce

*Studijní program:* N3942 – Nanotechnologie

*Studijní obor:* 3942T002 – Nanomateriály

*Autor práce:* **Bc. Jakub Vojtěch**

*Vedoucí práce:* prof. RNDr. David Lukáš, CSc.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC  
Faculty of Mechatronics, Informatics  
and Interdisciplinary Studies ■

# Vascular graft scaffolds prepared by AC electrospinning

## Diploma thesis

*Study programme:* N3942 – Nanotechnology  
*Study branch:* 3942T002 – Nanomaterials

*Author:* **Bc. Jakub Vojtěch**  
*Supervisor:* prof. RNDr. David Lukáš, CSc.



## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jakub Vojtěch**  
Osobní číslo: **M13000248**  
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**  
Studijní obor: **Nanomateriály**  
Název tématu: **Tkáňové nosiče pro cévní náhrady připravené technologií střídavého elektrického zvlákňování**  
Zadávací katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

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

1. Provedte literární průzkum na téma diplomové práce
2. Navrhněte a připravte polymerní roztoky biodegradabilních polyesterů a testujte jejich zvláknitelnost pomocí metody střídavého elektrického zvlákňování
3. Navrhněte části zařízení pro výrobu tkáňových nosičů maloprůměrových cév
4. Provedte technologické testy na zařízeních pro výroby tkáňových nosičů cév
5. Připravené tkáňové nosiče analyzujte (např. SEM, LUCIA, biologické testování)
6. Dosažené experimentální výsledky diskutujte



Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

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

Seznam odborné literatury:

1. Vacanti J., Principles of Tissue Engineering, academic press, New York, 2000 (kapitola 32. Blood vessels)
2. Bordes C., Determination of PCL solubility parameters, International Journal of Pharmaceutics, 383, 2010, 236-243
3. Lukas D. a col., effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production, Physical Chemistry and Chemical Physics, DOI:10.1039/C4CP04346D

Vedoucí diplomové práce:

**prof. RNDr. David Lukáš, CSc.**

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Konzultant diplomové práce:

**Ing. Pavel Pokorný, Ph.D.**

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání diplomové práce:


**5. října 2015**

Termín odevzdání diplomové práce:

**16. května 2016**

  
prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.  
děkan



  
prof. RNDr. David Lukáš, CSc.  
vedoucí katedry

V Liberci dne 5. října 2015

## Prohlášení

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

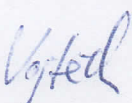
Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom 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.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

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

Datum: 16.5.2016

Podpis: 

## **Poděkování**

Ipek Yalcin, prostě za všechno. Manikandanu Sivanovi za to, že se se mnou rozdělil o své znalosti, Prof. RNDr. Davidu Lukášovi za moudré vedení, Ing. Denise Zálešákové za její rady a všem ostatním, kteří mi jakkoliv pomohli s vypracováním této práce. Jsem naplněn vděčností. Děkuji.

## Abstrakt

Polykaprolakton (PCL) je velmi vhodným materiálem pro tkáňové inženýrství. Většina rozpouštědel používaných pro elektrické zvláknění PCL je však toxická s ostatními je obtížné připravit nanovlákná. V této práci byla vyvinuta technologie přípravy nanovláknenného polykaprolaktonu s použitím alternativních rozpouštědlových systémů. Do roztoku PCL v chloroformu a etanolu bylo přidáno malé množství (20-120 $\mu$ l) kyseliny octové a mravenčí. Zvlákněním PCL z tohoto netoxického rozpouštědla se podařilo připravit nanovlákná o průměrech 158 nm pro kyselinu octovou a 256 nm pro kyselinu mravenčí. FTIR testy ukázaly, že vlákna neobsahují žádné stopy zbytkového rozpouštědla. PCL byl dále zvlákněn technologií střídavého elektrického zvláknění. Byly připraveny cévní tkáňové nosiče o průměru 6 mm s průměry vláken 490 nm, 870 nm a 1,57  $\mu$ m. Díky rotujícímu kolektoru se podařilo dosáhnout orientované vláknenné struktury, která je vhodná pro růst hladkých svalových buněk. Kombinace těchto dvou technologií by mohla do budoucna sloužit ke konstrukci vícevrstvých cévních tkáňových nosičů.

**Klíčová slova:** tkáňové inženýrství, tkáňový nosič, maloprůměrové cévní náhrady, polykaprolakton, střídavé elektrické zvláknění

## Abstract

Polycaprolactone (PCL) is a very useful material for tissue engineering. Unfortunately almost all solvents that are used for PCL electrospinning are toxic and the rest of them is not suitable for nanofiber production. In this work a technology for PCL nanofiber production with alternative solvent system was developed. A solution of PCL in chloroform:ethanol was prepared and a little amount (20-120 $\mu$ l) of acetic and formic acid was added to the solution. Nanofibers with average diameter of 158 nm were produced using acetic acid and fibers of average diameter 256 nm were achieved using formic acid. FTIR test showed that there is no harmful solvent left inside samples. Then PCL was electrospun using alternating current electrospinning technology. Scaffolds with inner diameter of 6 mm were produced with average fiber diameters of 490 nm, 870 nm and 1,57  $\mu$ m. Thanks to the rotating collector an oriented fibrous structure favorable for smooth muscle cells growth was achieved. Combination of these two techniques can be very useful for future scaffold construction.

**Keywords:** Tissue engineering, scaffold, small diameter vascular graft, polycaprolactone, alternating current electrospinning



# Obsah

1. Úvod .....	10
2. Teoretická část .....	13
2.1. Céva a její charakteristiky .....	13
2.2. Tkáňové inženýrství cévních implantátů .....	15
2.3. Nanovláknenné tkáňové nosiče .....	17
2.3.1. Chemické složení .....	17
2.3.2. Struktura tkáňového nosiče .....	18
2.3.3. Mechanické vlastnosti tkáňových nosičů .....	20
2.4. Cévní tkáňové nosiče připravené elektrickým zvlákňováním .....	21
2.4.1. Aparatura pro výrobu cévních tkáňových nosičů .....	21
2.4.2. Výroba cévních tkáňových nosičů s orientovanou nanovláknennou strukturou ..	22
2.4.3. Biologické vlastnosti tkáňových nosičů .....	24
2.5. Střídavé elektrické zvlákňování .....	27
2.5.1. Aparatura pro střídavé elektrické zvlákňování .....	28
2.5.2. Střídavé elektrické zvlákňování pro biologické aplikace .....	30
3. Experimentální část: Alternativní rozpouštědla pro elektrické zvlákňování PCL .....	31
3.1. Materiály a metody .....	31
3.1.1. Chemické látky a roztoky .....	31
3.1.2. Elektrické zvlákňování .....	32
3.1.3. Charakterizace vzorků .....	33
3.2. Výsledky .....	34
3.2.1. Vlastnosti roztoků .....	34
3.2.2. Morfologie vláken .....	36
3.2.3. Výsledky měření průměrů vláken .....	38
3.2.4. Měření porozity a velikosti pórů .....	40
3.2.5. FTIR analýza .....	42
4. Experimentální část: Příprava nanovláknenného tkáňového nosiče AC elektrickým zvlákňováním .....	43
4.1. Materiály a metody .....	43
4.2. Elektrické střídavé zvlákňování roztoků .....	44
4.3. Výsledky .....	46

4.3.1. Morfologie vláken .....	46
4.3.2. Orientace vláken.....	47
4.3.3. Mechanické vlastnosti .....	48
4.4. Návrh a konstrukce aparatury pro střídavé elektrické zvlákňování .....	49
5. Závěr.....	51
Seznam použité literatury:.....	52

# 1. Úvod

Cévní onemocnění jsou dnes jedním z nejrozšířenějších důvodů úmrtí [1]. Přestože na trhu existuje řada implantátů pro náhradu cév o průměru větším, než 6 mm, pro cévy o nižším průměru jsou současné technologie zcela nedostatečné. V podstatě jedinou reálnou možností jsou autotransplantáty [1]. Pokrok v této oblasti je tedy velmi zásadní. Je třeba vyrobit implantát, který bude splňovat všechny potřebné funkce původní cévy. Musí být tolerován organismem, jeho vnitřní povrch by měl umožňovat proudění krve bez tvorby krevních sraženin a zároveň je třeba, aby měl vhodné mechanické vlastnosti.

Jednou z velmi nadějných cest je tkáňové inženýrství. Cílem tohoto postupu je výroba implantátu, který je tvořen živými buňkami pacienta. Takový postup má tu výhodu, že výsledná céva je schopná se velice kvalitně integrovat do organismu, je schopná regenerace a tím zajišťuje dlouhodobou funkčnost. Přestože některým výzkumným týmům [5] [7] [8] se již podařilo vyrobit takovou živou cévní náhradu in vitro a prokázat její funkčnost in vivo u lidí, metoda výroby takové cévy je značně zdlouhavá (řádově měsíce). Další výzkumné týmy (Lee a kol. [42], He a kol. [43], Yalcin a kol. [10] a další) se snaží zkrátit tuto dobu využitím tzv. tkáňových nosičů – struktury, která funguje jako dočasná opora pro růst buněk. Tkáňový nosič může sám sloužit jako implantát a poskytnout organismu čas na regeneraci tkání. V takovém případě mají materiálové a strukturní charakteristiky tkáňového nosiče zcela zásadní vliv na chování buněk i na to, zda bude organismem vůbec přijat [1].

Vědci se shodují na tom, že tkáňový nosič by svou strukturou měl co nejvíce připomínat extracelulární matrix (ECM) a tím zajišťovat buňkám co nejvíce přirozené prostředí [46]. ECM je síť na úrovni nanometrů tvořená proteiny a glykosaminoglykany. Tato komplexní struktura buňkám poskytuje signály, podle kterých se buňky řídí. Interakce mezi buňkami a extracelulární matrix může vést k různým buněčným aktivitám, jako je migrace, proliferace, diferenciaci, genová exprese, případně vylučování různých hormonů [46]. To vše klade vysoké nároky na strukturu a chemické složení tkáňového nosiče, který svou funkcí zastupuje extracelulární matrix.

Jednou z nejrozšířenějších technologií pro výrobu cévních tkáňových nosičů je elektrické zvláknění. Tato technologie umožňuje výrobu nanovláknenných materiálů, které mají díky své unikátní struktuře pozitivní vliv na buněčný růst a připomínají svou strukturou extracelulární matrix. Tato technologie je velice univerzální, umožňuje zvláknění mnoha biokompatibilních polymerů a je i cenově dostupná [46].

Tato práce se zaměřuje na elektrické zvlákňování polykaprolaktonu (PCL) – polymeru, který je velice vhodný pro biologické aplikace, včetně výroby tkáňových nosičů a má i vhodnou rychlost biodegradability [13]. Pro jeho zvlákňování byly použity dvě různé technologie – stejnosměrné (DC) elektrické zvlákňování a střídavé (AC) elektrické zvlákňování. Pokud nebude třeba bezprostřední rozlišení těchto dvou technologií, bude v dalším textu stejnosměrné zvlákňování označováno tak, jak je zvykem – tedy elektrické zvlákňování. Cílem bylo připravit nanovlákněné vrstvy s vhodnou strukturou, které by mohly sloužit jako jednotlivé vrstvy nanovlákněného tkáňového nosiče.

První polovina práce má formu literárního průzkumu. Popisuje technologii tkáňového inženýrství, snaží se zachytit vlastnosti, které by měl nanovlákněný tkáňový nosič splňovat a shrnuje poznatky od dalších autorů z oblasti výroby cévních tkáňových nosičů elektrickým zvlákňováním a také popisuje technologii střídavého elektrického zvlákňování. Experimentální část práce je pak rozdělena na dva oddíly, první se zaměřuje na stejnosměrné elektrické zvlákňování PCL s použitím alternativních rozpouštědlových systémů, druhý na výrobu cévních tkáňových nosičů střídavým elektrickým zvlákňováním.

## **Stručný přehled**

### **Teoretická část**

#### **Céva a její charakteristiky:**

Popis cévy, její struktura, chemické a biologické složení a její vlastnosti

#### **Tkáňové inženýrství cévních implantátů**

Vysvětlení technologie tkáňového inženýrství, jejích možností a úrovně současných znalostí.

#### **Nanovlákněné tkáňové nosiče**

Co je to tkáňový nosič a charakteristika různých aspektů z hlediska struktury, mechanických vlastností a chemického složení.

### **Cévní tkáňové nosiče připravené elektrickým zvlákňováním**

Popis výroby cévních tkáňových nosičů elektrickým zvlákňováním, různé varianty elektrického zvlákňování, určené pro dosažení orientované vlákně struktury a vliv takové struktury na chování buněk. Kapitola dále obsahuje studie, které popisují přípravu nanovlákněných cévních tkáňových nosičů a jejich testování in vitro a in vivo.

### **Střídavé elektrické zvlákňování**

Popis jevu AC elektrického zvlákňování a aparatury a zvlákňování PCL touto technologií

## **Experimentální část**

### **Alternativní rozpouštědlový systém pro elektrické zvlákňování PCL**

Elektrické zvlákňování PCL rozpuštěného v roztoku chloroformu a etanolu s přidáním malého množství kyseliny octové a kyseliny mravenčí. Charakterizace připravených vzorků

### **Příprava nanovlákněného tkáňového nosiče AC zvlákňováním**

AC elektrické zvlákňování roztoku PCL v kyselině octové s malým množstvím octanu sodného pro zvýšení vodivosti roztoku. Charakterizace morfologie a mechanických vlastností vzorků.

## 2. Teoretická část

Výroba tkáňových nosičů pro cévní implantáty je komplexní záležitostí. V rámci teoretické části diplomové práce se budu zabývat různými aspekty této problematiky. Popíšu strukturu cévy, dále se budu zabývat tkáňovým inženýrstvím cévních implantátů a vlastnostmi klíčovými pro cévní tkáňové nosiče. V dalších kapitolách se pak budu věnovat využití elektrického zvlákňování při výrobě cévních tkáňových nosičů. Zaměřím se na výrobu tkáňových nosičů s orientovanou vláknennou strukturou. Nakonec popíšu technologii střídavého elektrického zvlákňování, která by mohla být pro výrobu cévních tkáňových nosičů klíčová.

### 2.1. Céva a její charakteristiky

Přírodní céva není jen obyčejná pasivní trubice, která vede krev. Má schopnost měnit své rozměry a to jak z krátkodobého hlediska, tak i z hlediska dlouhodobého. To je důležité pro zachování adekvátních podmínek pro proudění krve a zachování průchodnosti cévy. Malopřůměrové cévy navíc hrají důležitou roli při regulaci proudu krve. Stahují se a roztahují na základě nervové, či hormonální stimulace, případně na základě samoregulace. [1]

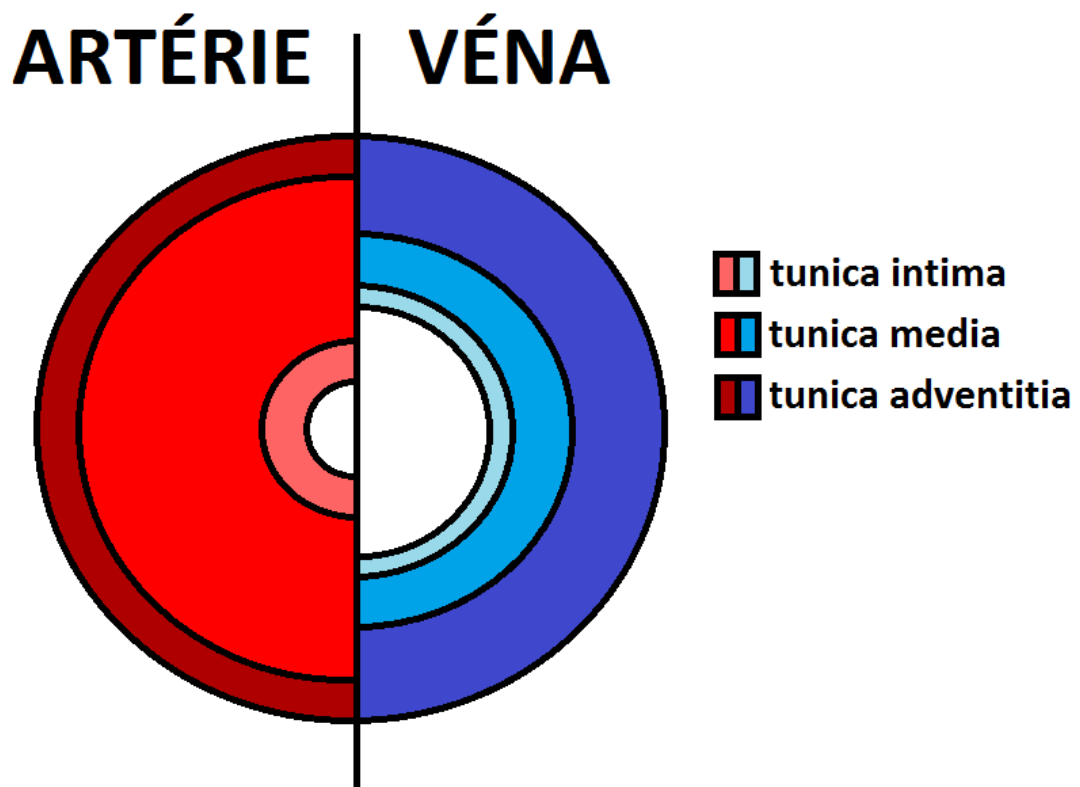
Vnitřní vrstva se nazývá *tunica intima*. Intimu tvoří jednovrstvá plocha *endotelu*. Jedná se o ploché buňky uspořádané ve směru toku krve. Intima poskytuje hladký povrch a zabraňuje adhezi krevních destiček a bílých krvinek k povrchu cévy. Současně přes tuto vrstvu probíhá transport látek, a to aktivně i pasivně. Endoteliální buňky také dokáží reagovat na podmínky uvnitř cévy a vylučovat signalizační molekuly a tím tok krve regulovat. Od střední vrstvy je oddělena membránou (tzv. bazální laminou) tvořenou *kolagenem* typu IV, *lamininem* a *fibronectinem*. [1]

Střední vrstva (*tunica media*) tvoří nejtlustší část stěny cévy a je odpovědná za většinu mechanických vlastností. Je tvořena několika vrstvami *hladkých svalových buněk*, *kolagenem* typu I a III, vlákny *elastinu* a různých proteoglykanů. Díky elastinu je céva pružná, zatímco kolagen zabraňuje přílišnému natažení. Buňky a mimobuněčná hmota (extracelulární matrix) jsou uspořádány v soustředných vrstvách a tak tvoří komplexní strukturu, která umožňuje zachovat průsvit cévy i při jejím ohybu [2]. Tato vrstva je také odpovědná za regulaci proudění krve prostřednictvím stahování a uvolňování na základě interakce s endoteliálními buňkami.

Vnější vrstva (*tunica adventitia*) se skládá z *fibroblastů*, náhodně uspořádaných vláken

*kolagenu* (typ I), *elastinu*, a nervů. Také se podílí na mechanických vlastnostech, převážně ukotvením k okolní tkáni [1].

Tepny mají oproti žilám značně vyvinutější tunicu mediu. Tepna se tlakem rozšíří a až poté vypudí krev dál. Díky tomu je proud krve rovnoměrný, přestože srdce mezi jednotlivými stahy odpočívá. Žíly mají tenčí stěnu a jsou méně pružné a na rozdíl od tepen mají chlopně, které brání zpětnému toku krve. Nejtlustší tepnou je aorta, která dosahuje průměru až 30 mm. Průměr ostatních velkých tepen se pohybuje kolem 8-10 mm a jejich větve mají pak od 3 do 5 mm. [3]



*Obrázek 1: Schématická struktura cévy. Céva se skládá ze 3 vrstev. Vnitřní vrstva je tunica intima. Je nejtenčí a zajišťuje kontakt s krví. Střední vrstva, tunica media zajišťuje mechanické vlastnosti cévy. Skládá se především z hladkých svalových buněk, orientovaných v soustředných vrstvách. Vnější vrstva je tunica adventitia. Je složena převážně z fibroblastů a zajišťuje hlavně ukotvení k ostatním tkáním. Dále obrázek ukazuje rozdíl mezi strukturou tepny a žíly. Na obrázku můžeme vidět, že intima media u žíly je výrazně tenčí, než u tepny. Žíly mají navíc chlopně. [50]*

## 2.2. Tkáňové inženýrství cévních implantátů

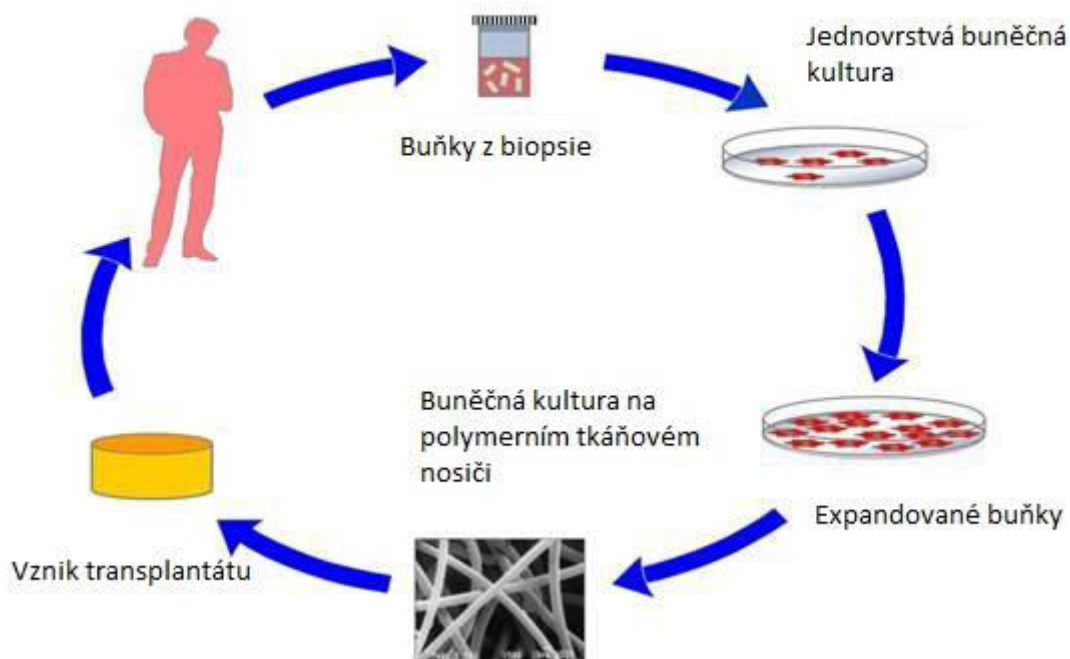
Vývoj cévních implantátů na principu tkáňového inženýrství se v posledním desetiletí velmi rychle rozvíjí a to zejména kvůli potřebě nízkoprůměrových cév. Například jen ve spojených státech způsobují asi 20 % všech úmrtí onemocnění koronárních tepen. Každý rok je provedeno asi 500 000 operací a každá vyžaduje jednu maloprůměrovou tepnu [1]. Bohužel, ne vždy je k dispozici náhradní céva, kterou by bylo možné použít a syntetické implantáty jsou pro tepny o průměru nižším než 6 mm nepoužitelné. Dochází v nich ke srážení krve díky nevhodnému vnitřnímu povrchu a také kvůli nevhodným mechanickým vlastnostem [1]. Je tedy třeba vyvinout nový cévní implantát a to především právě pro maloprůměrové cévy.

Ideální cévní implantát by se měl podobat co nejvíce biologické cévě. Biologická céva je poměrně komplikovaná a přesné napodobení je zatím prakticky nemožné. Je to však ideál, ke kterému je třeba se přibližovat, snažit se zachytit její základní charakteristiky a ty zakomponovat do implantátu. Základem náhrady je, aby měla vhodné mechanické vlastnosti – je třeba, aby vydržela tlak krve, zachovávala si průsvit při ohybu a bylo možné ji našít na původní cévu. Zároveň by však měla mít podobnou pružnost jako přírodní céva – implantáty selhávají často proto, že rozdíly mezi mechanickými vlastnostmi na rozhraní mezi původní cévou a implantátem jsou příliš velké [24]. Důležitý je také vnitřní povrch cévní náhrady. Ten se u původní cévy skládá z endoteliálních buněk. Ty tvoří velice hladkou, dlaždicím podobnou souvislou strukturu, která je v kontaktu s krví. Je tedy třeba, aby byl i vnitřní povrch implantátu co nejhladší. Samozřejmě je také nutné, aby implantát nevyvolával zánětlivé reakce. [1]

Cílem tkáňového inženýrství je výroba živého orgánu tvořeného buňkami pacienta. Takový orgán se může připravit in vitro. V tom případě se buňky pěstují na tzv. tkáňovém nosiči (scaffoldu) a následně se orgán implantuje do pacientova těla. Schůdnost tohoto postupu v případě cévních tkáňových implantátů dokázal Shin'oka a kol. [5] [7] a H'eureux a kol. [8], kdy byly implantovány cévní náhrady připravené tkáňovým inženýrstvím lidem. Tento postup je funkční, jeho nevýhodou však je přílišná zdlouhavost (příprava náhrady trvá asi 3 měsíce [5] a 4-5 měsíců [8]).



## Základní princip tkáňového inženýrství



Obrázek 2: Základní princip tkáňového inženýrství: Buňky se odeberou od pacienta (tzv. biopsie), napěstují se *in vitro*, poté se nanese na tkáňový nosič. Vzniklý implantát může být voperován zpět do těla pacienta. [51]

Druhou variantou, která je pro cévní implantáty vhodnější, je implantace samotného tkáňového nosiče. V tomto případě se očekává, že organismus sám bude zdrojem buněk. Postup vyžaduje, aby tkáňový nosič dočasně působil jako cévní náhrada a poskytl organismu čas na regeneraci tkáně. [1]

V každém případě je zřejmé, že céva připravená technologií tkáňového inženýrství bude ideálním implantátem. Je to živá struktura, tvořená buňkami pacienta. Může se velice dobře spojit s okolními tkáněmi a také má schopnost regenerace a může vykonávat i funkce, jako je látková výměna, což je u syntetických implantátů zcela nemožné. Dokonce, jak dokázal H'eureux [5], v případě dětských pacientů má implantát schopnost přizpůsobit se růstu – průměr cévy se postupně zvětšuje. Díky těmto vlastnostem můžeme považovat takovou náhradu za trvalé řešení problému. Po implantaci takové cévy není třeba žádných dalších zásahů, což je výhodné především pro pacienta, který pak nemusí podstupovat další zákroky. [1]

## 2.3. Nanovláknenné tkáňové nosiče

Tkáňový nosič slouží jako dočasná náhrada extracelulární matrix. Poskytuje buňkám trojrozměrnou strukturu, ke které se mohou přichytit a rozvíjet se. V organismu je většina buněk v kontaktu s extracelulární matrix (ECM) – sítě na úrovni nanometrů tvořené proteiny a glykosaminoglykany. Tato komplexní struktura buňkám poskytuje signály/informace, podle kterých se buňky řídí. Interakce mezi buňkami a extracelulární matrix může vést k různým buněčným aktivitám, jako je migrace, proliferace, diferenciaci, genová exprese, případně vylučování různých hormonů. To vše klade na tkáňový nosič, který svou funkcí zastupuje extracelulární matrix, vysoké nároky z hlediska jeho struktury a chemického složení – je zřejmé, že je třeba, aby tkáňový nosič co nejvíce připomínal extracelulární matrix. [46]

Jednou z nejvhodnějších metod výroby cévních tkáňových nosičů je elektrické zvláknování. Jedná se to o technologii snadnou a cenově dostupnou (ve srovnání s fázovou separací, či samouspořádáním) [46]. Umožňuje výrobu scaffoldu se strukturou vzájemně propojených pórů a průměry vláken řádově v nanometrech. Dále je možné touto technologií zvláknit řadu polymerů, včetně mnoho biodegradabilních [46]. Protože se tato práce zaměřuje právě na využití elektrického zvláknování, budou další části zaměřené na nanovláknenné nosiče připravené elektrickým zvláknováním.

Základním předpokladem pro tkáňový nosič je biokompatibilita. Implantát nesmí v organismu vyvolávat nepřátelskou reakci, musí být schopen se do organismu integrovat. Scaffold by měl svojí architekturou připomínat co nejvíce extracelulární matrix. Další klíčové vlastnosti jsou porozita a velikost pórů, mechanické vlastnosti a chemické složení vhodné pro buňky. Těmto aspektům se tedy budu věnovat v dalších podkapitolách.

### 2.3.1. Chemické složení

Při výrobě cévních tkáňových nosičů se obvykle používají biodegradabilní materiály. Tento koncept využil poprvé Bowald a kol. [22] v roce 1979. Spočívá ve využití materiálu, který plní dočasně mechanickou funkci, ale organismus materiál postupně rozkládá a jeho místo zaujmají buňky a vlákna mimobuněčné hmoty. Nakonec organismus materiál vstřebá úplně a zbyde živý orgán (buňky a extracelulární matrix), který je schopen samostatné, plnohodnotné funkce [1]. Samozřejmě je snahou najít materiál (nebo kombinaci materiálů), který co nejvíce podporuje buněčnou proliferaci.

Z biologických materiálů se nejvíce využívají kolagen, gelatin, chitosan, případně různé polysacharidy. Ze syntetických materiálů to jsou nejčastěji kyselina polyglykolová (PGA) a polymléčná (PLA), polykaprolakton (PCL), polyuretany (PU) a polydioxanon (PDS). Podrobnější charakteristiky těchto polymerů je možné najít například zde: Hutmacher [13] a Gunatillake [12].

### 2.3.2. Struktura tkáňového nosiče

Extracelulární matrix má významný vliv na chování buněk tím, že zajišťuje jejich organizaci v prostoru [46]. Již v roce 1963 bylo doloženo [38], že nanostruktury mají vliv na buněčné chování. Je tedy třeba pochopit, jak se buňky chovají ve vztahu k nanovláknům a dále využít těchto poznatků.

To, jak moc jsou buňky schopny proniknout do scaffoldu je značně závislé na jeho porozitě a velikosti pórů. Tyto vlastnosti mají tedy značný vliv na funkci celého implantátu. Otevřená struktura vzájemně propojených pórů je zásadní pro proliferaci a migraci buněk, ale také rozvod živin. Porézní povrch také umožňuje mechanické uchycení scaffoldu v okolních tkáních a tím zajišťuje jeho stabilitu. [17]

Nanovláknna se vůči buňkám chovají poměrně poddajně. Boland a kol. [16] ve své studii ukázal, že buňky mohou infiltrovat i strukturu s průměrnou velikostí pórů pouhých 1,5  $\mu\text{m}$ . Tento výsledek dále konfrontuje s informací, že pro infiltraci buněk do běžných porézních materiálů je vzhledem k jejich velikosti třeba pórů o velikosti minimálně 10  $\mu\text{m}$ . Z toho vyvozuje, že buňky jsou schopné jednotlivá vlákna odstrkovat – nanovláknna se tedy chovají poddajně.

Lowery a kol. [18] zkoumal vliv velikosti pórů mezi vlákny na chování buněk u PCL nanovláknenných vrstev. Uvádí, že největší vliv na proliferaci buněk se projevuje u průměrné velikosti pórů mezi 6 a 14  $\mu\text{m}$ . Menší póry omezují migraci buněk. U pórů velikosti mezi 20 a 36  $\mu\text{m}$  už změny nejsou pozorovány – buňky se mohou volně pohybovat a migrovat. V případě výrazně větších pórů se životnost buněk snižuje, nejspíš proto, že buňky nejsou schopné efektivně přemostit příliš velké mezery. Dále uvádí, že pro vytvoření bariéry, kterou buňky nedokáží překonat, je třeba pórů o rozměrech menších než 1  $\mu\text{m}$ . Lowery tedy uvádí ideální velikost pórů mezi 6 a 20  $\mu\text{m}$ . Jako obecné pravidlo udává, že je třeba, aby se velikost pórů pohybovala mezi  $\pm 50\%$  velikosti buněk.

Szentivanyi a kol. [17] ve svém článku na základě studií ostatních autorů tuto hranici potvrzuje. Jako ideální udává rozměry 5 až 50  $\mu\text{m}$ . To odpovídá velikosti buněk mezi 10 a 25  $\mu\text{m}$ . Výjimku z tohoto pravidla tvoří endoteliální buňky. Ty jsou schopné přemostit póry o průměru až 20  $\mu\text{m}$ . Szentivanyi a kol. [17] dále ve své práci dochází k závěru, že vzhledem k závislosti velikosti pórů na průměrech vláken bude pro vlákna o průměru menším, než 0,25  $\mu\text{m}$  docházet k migraci a proliferaci buněk především na povrchu tkáňového nosiče, zatímco vlákna o průměru 2  $\mu\text{m}$  a více již žádným výrazným způsobem chování buněk nebrzdí.

Dalším aspektem jsou průměry vláken scaffoldu. Chen a kol. [19] studoval vliv průměrů vláken na buňky u vysoce porézního PCL s velikostí pórů nad 50  $\mu\text{m}$ . Ve své studii zkoumal vlákna od průměrů 100 nm až po 1,6  $\mu\text{m}$ . Ukazuje se, že pro submikronová vlákna platí, že rychlost proliferace stoupá s klesajícím průměrem vláken. Výjimka nastává pouze u vláken s korálky, které proliferaci značně brzdí a také mají nežádoucí účinek na buněčnou morfologii. Na druhé straně, pro vlákna s průměrem nad 1  $\mu\text{m}$  rychlost proliferace roste s rostoucím průměrem. Svým výzkumem to potvrzuje i Del Gaudio a kol. [28]. Tento trend byl dále ověřen i pro vlákna s většími průměry, až do 5,5  $\mu\text{m}$  [18], [21].

Na submikronových vláknech se buňky zachytávají lépe. To Chen a kol. [19] vysvětluje tím, že nanovlákna mají výrazně větší specifický povrch a díky tomu dokáží mnohem lépe adsorbovat proteiny.

Dalším zásadním aspektem, který ovlivňuje chování buněk na scaffoldu je vlákenná orientace. Xu a kol. [39] zkoumal chování hladkých svalových buněk na orientovaných vláknech kopolymeru kyseliny polymléčné a PLC. Autor uvádí, že buňky se k vláknům přichytávali ve směru jejich osy a také podél nich migrují. Buňky pěstované na orientovaných vláknech dále zaujímají přirozený protáhlý tvar, na rozdíl od buněk pěstovaných na náhodně orientovaných vláknech, které se přichytávají na více vláknech současně a zaujímají pyramidální tvar s náhodně orientovanými aktinovými vlákny. Autor dále uvádí zvýšenou schopnost adheze a proliferace buněk. Zhu a kol. [27] ve své práci ukazuje, že podobný vliv na hladké svalové buňky mají i mikrovlákna o průměru 10  $\mu\text{m}$ . K podobným výsledkům dochází i Li a kol. [45] na vláknech PCL.

Lee a kol. [26] ve své studii týkající se orientovaných polyuretanových nanovláken uvádí, že buňky pěstované na orientovaných vláknech vykazují výrazně větší (až dvojnásobnou) produkci kolagenu, než buňky pěstované na vláknech s náhodnou orientací.

Orientovaná nanovlákenná struktura dále vykazuje anizotropní mechanické vlastnosti oproti náhodně orientovaným vláknům. To dokazuje Li a kol. [45], ve své studii. Uvádí, že

pokud jsou vlákna při výrobě vystavena mechanickému tažení, jako například při navíjení na rotující kolektor při vyšších rychlostech, dochází k ovlivnění jejich krystalické struktury. Krystaly ve vláknech se orientují ve směru osy vlákna a tím se mechanické vlastnosti vláken ještě posilují. Pokud je vzorek namáhán ve směru orientace, síla se může rozložit rovnoměrně mezi všechna vlákna. U rotujícího kolektoru je navíc možné určit hustotu vláken. Čím vyšší rychlost rotace je aplikovaná, tím vyšší je hustota nanovlákněné vrstvy a menší prostor mezi jednotlivými vlákny. [19]

### 2.3.3. Mechanické vlastnosti tkáňových nosičů

Mechanické vlastnosti jsou klíčovým parametrem, který předurčuje, zda je scaffold možné použít k implantaci. Je zřejmé, že musí být dostatečně pevný, aby dokázal odolávat tlaku krve. Pevnost v protržení je tedy jednou ze základních charakteristik. Dále je třeba, abych bylo možné scaffold našít na původní cévu (měření pevnosti švu). Syntetické náhrady pak často (především v dlouhodobém časovém horizontu) selhávají kvůli nedostatečné pružnosti materiálu. [9]

Pevnost v protržení je jedním z nejdůležitějších parametrů, potřebných k implantaci scaffoldu. Obecně je uváděno, že tato hodnota by měla být vyšší, než 2000 mm Hg. Na druhou stranu je nutné si uvědomit, že tlak při roztržení je lineárně závislý na průměru scaffoldu. Při zachování stejné tloušťky stěny bude tlak potřebný pro prasknutí scaffoldu o vnitřním průměru 2 mm 2x větší, než u scaffoldu o vnitřním průměru 4 mm. [9]

Pevnost švu je další důležitou charakteristikou pro cévní implantát. König [9] uvádí hodnotu pro přírodní cévu  $138 \pm 50 \text{ g/cm}^2$  (oboustranná vnitřní mamární tepna), ovšem dodává, že při použití cévních implantátů připravených procesem tkáňového inženýrství (jedna z mála studií zahrnující lidské pacienty) byli použity implantáty s hodnotou výrazně nižší ( $75 \text{ g/cm}^2$ ) a nedošlo k žádným operačním ani pooperačním komplikacím. König za hraniční hodnotu uvádí  $50 \text{ g/cm}^2$  s odůvodněním, že chirurg má možnost použití stehů různých typů a hustoty.

Posledním parametrem pro cévní implantát je jeho pružnost. Podle Nerema [11] nevhodná pružnost implantátu může vést k selhání náhrady po delší době – neprojeví se tedy okamžitě. Tento parametr je v případě cévních implantátů připravených tkáňovým inženýrstvím, jak dokazuje König [5], nejméně důležitým, jelikož se působením buněk charakteristika implantátu mění s časem a přizpůsobuje se podmínkám. Ve své práci uvádí pružnost oboustranné vnitřní

mamární tepny 11,5 %/100 mm Hg. Céva připravená technologií tkáňového inženýrství měla před implantací pružnost 3,4 %/100 mm Hg. Šest měsíců po implantaci se tato hodnota zvedla na 8,8%.

## 2.4. Cévní tkáňové nosiče připravené elektrickým zvlákňováním

Elektrické zvlákňování je technologie velice vhodná pro přípravu cévních tkáňových nosičů. Umožňuje výrobu vláken o průměrech od desítek nanometrů do jednotek mikrometrů a také zvlákňování značného množství polymerů vhodných pro biologické aplikace. Vláknem připravená elektrickým zvlákňováním tvoří porézní strukturu, která připomíná mezibuněčnou hmotu. Navíc je možné vlákna sbírat na válcový kolektor a tím získat tvar cévy. Válcový kolektor současně umožňuje výrobu orientované struktury. [46]

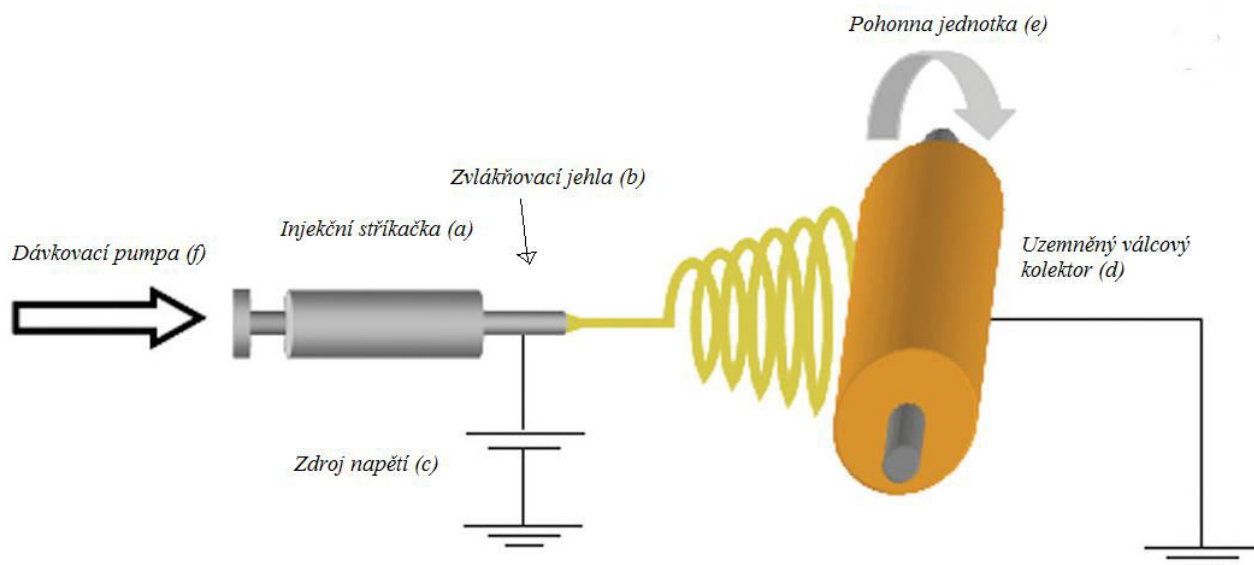
Následující část shrnuje poznatky o přípravě cévních tkáňových nosičů různých materiálů a struktur. Zahrnuje technologii výroby cévních tkáňových nosičů elektrickým zvlákňováním, různé varianty elektrického zvlákňování vedoucí k dosažení orientovaných vláken, která mohou mít velmi pozitivní vliv na vlastnosti tkáňového nosiče [39] a dále výzkumy na téma mechanických a biologických vlastností těchto materiálů.

### 2.4.1. Aparatura pro výrobu cévních tkáňových nosičů

Pro výrobu nanovlákných cévních tkáňových nosičů elektrickým zvlákňováním se obvykle používá aparatura pro elektrické zvlákňování s válcovým kolektorem. Díky rotaci kolektoru jsou vlákna sbírána rovnoměrně a zaujímají tak trubicovitý tvar. Pro malopřůměrové tkáňové nosiče se používají kolektory o průměry menším, než 6 mm.

Na obrázku 3 je schématické znázornění aparatury pro výrobu cévních tkáňových nosičů. Aparatura je složena z injekční stříkačky (Obrázek 3 a), ve které je umístěn polymer. Zvlákňování probíhá z kovové jehly (Obrázek 3 b), která je připojena na zdroj napětí (Obrázek 3 c). Vláknem jsou sbírána na válcový rotační kolektor (Obrázek 3 d), který je připojen na

pohonnou jednotku (Obrázek 3 e), která zajišťuje rotaci. Dávkovací pumpa (Obrázek 3 f) zajišťuje rovnoměrný přísun polymeru. Dále je vhodná regulace vlhkosti okolního prostředí, která může mít značný vliv na proces zvlákňování. [46]



Obrázek 3: Aparatura pro výrobu nanovlákněných cévních tkáňových nosičů elektrickým zvlákňováním. Polymer je uložen v injekční stříkačce (a) a zvlákňování probíhá z kovové jehly (b), která je připojena na zdroj napětí (c). Vlákna jsou sbírána na válcový rotační kolektor (d), který je připojen na pohonnou jednotku (e), která zajišťuje rotaci. Dávkovací pumpa (f) zajišťuje rovnoměrný přísun polymeru. [46]

#### 2.4.2. Výroba cévních tkáňových nosičů s orientovanou nanovlákněnou strukturou

Orientovaná vlákněná struktura může být pro výrobu cévních tkáňových nosičů velice zásadní. Jedním z důvodů je například to, že i střední vrstva cévy (tunica media) je tvořena orientovanou strukturou buněk a extracelulární matrix [1]. Následující část pojednává o tom, jakými metodami je možné takovou strukturu připravit a také jaké výhody cévním tkáňovým nosičům orientovaná vlákna přinášejí.

Jednou z metod přípravy vláken orientovaných jedním směrem je využití kolektorů různých tvarů, případně kombinace vodivých a nevodivých částí.[28], [30], [31], [32]. Další variantou je sbírání vláken na kolektor ve tvaru rotujícího disku [33], [34], [35], [36]. Jedná se o metodu, sloužící k přípravě velice dobře orientovaných vláken, jednak díky tomu, že hrana disku je úzká a jednak kvůli deformaci elektrického pole. Přestože se tyto metody příliš nehodí přímo k přípravě nanovláknenných tkáňových nosičů, je možné takto připravené nanovláknenné vrstvy zkoumat a získávat informace o jejich vlastnostech.

Na druhé straně pro vlastní výrobu cévních tkáňových nosičů je ideální cestou použití válcového rotačního kolektoru. To především z toho důvodu, že nanovrstva získaná tímto postupem zaujímá přímo trubicovitý tvar, jehož vnitřní průměr je definován průměrem kolektoru. Edwards a kol. [37] pracoval s válcovým kolektorem o průměru 3,2 cm a délce 9,2 cm. Ve svých pokusech zkoumal vliv rychlosti otáčení kolektoru na strukturu vláken PCL. Nejnižší použitá obvodová rychlost byla 0,8 m/s a nejvyšší pak 6,9 m/s. Autor uvádí, že při nižší obvodové rychlosti (asi do 2 m/s) dochází pouze k částečné orientaci a vlákna nejsou nijak deformována. Při vyšších rychlostech otáčení již dochází k mechanickému tažení vláken, které vede k jejich uspořádání. Tažením dochází také ke snižování průměrů těchto vláken a současně ke změně krystalické struktury polymeru. Při rychlostech nad 5 m/s již dochází k mechanickému poškozování vláken, trhají se. Jako ideální rychlost otáčení pro výrobu orientovaných vláken autoři uvádí 2,5 m/s.

Jelikož hlavním cílem je příprava malopřůměrových scaffoldů, je třeba sbírat vlákna na válcový kolektor s průměrem 6 mm a méně. Orientace vláken je možné dosáhnout při dostatečných otáčkách kolektoru [23], [10], přestože je to technologicky poměrně obtížné jak dodává Wu [23], jelikož s klesajícím průměrem kolektoru rostou otáčky potřebné k dosažení kvalitní orientace.

Přesto existují studie, které posupují touto cestou. Jednu z nich vypracoval Vaz a kol. [23] Úspěšně připravil dvouvrstvý scaffold zvlákněním na rotující válcový kolektor o průměru 6 mm a délce 6 cm. První vrstva byla připravena z náhodně orientovaných vláken PCL, druhou vrstvu tvořila orientovaná vlákna PLA. Tloušťka stěny scaffoldu byla asi 600  $\mu\text{m}$ . K dosažení vláknenné orientace byla potřebná úhlová rychlost 6,8 m/s. Průměry takto připravených vláken se pohybovaly od 800 nm do 3  $\mu\text{m}$ .

Yalcin a kol. [10] připravila scaffold s orientovanými PCL vlákny o průměru 6 mm. Ve studii byly použity otáčky od 250 (0,075 m/s), 5 000 (1,5 m/s), 10 000 (3 m/s) a 15 000 (4,5



m/s) RPM. Při použití otáček 15000 RPM bylo dosaženo již velmi dobře orientovaných vláken.

Wu a kol. [24] navrhuje novou metodu výroby orientovaných vláken pro malopřůměrové cévní scaffoldy. Orientovaných PCL vláken dosáhl použitím 2 kovových desek, připojených na zdroj negativního napětí, které fungovaly jako protielektrody. Jejich postavením rovnoběžně s kolektorem, vyrobeným z nevodivého teflonu, mohl dosáhnout velice kvalitní orientované struktury na kolektoru o průměru 4,5 mm i při velice nízkých otáčkách (do 300 RPM). Navíc, při otáčkách kolem 50 RPM, pokud byly desky umístěny kolmo ke kolektoru, bylo možné dosáhnout axiálně orientované nanovláknenné struktury. Autor ve své práci navrhuje, že axiálně orientovaná vlákna by mohla být použita pro vnitřní vrstvu scaffoldu.

Grasl a kol. [36] používá pro výrobu uspořádané vláknenné struktury velice univerzální metodu využívající 2 paralelních přídavných elektrod, na něž je přiváděn střídavě potenciál o frekvenci 40 Hz. Vlákno je tedy střídavě přitahováno k jedné z přídavných elektrod, což vede k vytvoření orientované struktury. Autor uvádí, že s touto technologií je možné dosáhnout libovolné orientace vláken.

### 2.4.3. Biologické vlastnosti tkáňových nosičů

Abychom mohli zhodnotit jednotlivé technologické postupy a použité materiály, je třeba se podívat na to, jak se v praxi osvědčily po osazení buňkami. V této sekci se tedy podíváme na konkrétní studie in vitro a jejich výsledky.

Xu a kol. [39] připravil nanovláknennou vrstvu tvořenou orientovanými vlákny PLCL (kopolymeru PLA a PCL v poměru 75:25). Strukturu tvořila vlákna o průměru kolem 500 nm. Byla testována interakce těchto vláken s hladkými svalovými buňkami. Jako kontrola sloužila vrstva PLCL a polystyrenové destičky pro tkáňové kultury. Buňky vykazují pozitivní reakci, přichytávají se a prolifерují rychleji, než na vrstvě a srovnatelně s destičkami pro tkáňové kultury. Během 7 dnů počet buněk vzrostl 4 násobně.

Lee a kol. [41] připravil sérii scaffoldů z různých materiálů. Směs se vždy skládala ze 45 % kolagenu, 15 % elastinu a 40 % biodegradabilního syntetického polymeru – kyseliny polymléčné (PLA), kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) polykaprolaktonu (PCL) a kopolymeru kyseliny mléčné a kaprolaktonu (PLCL). Scaffoldy byly tvořeny náhodně orientovanými vlákny o průměrech od 477 do 765 nm. Syntetický polymer měl za úkol

především přizpůsobení mechanických vlastností scaffoldu, aby co nejvíce odpovídaly přírodní cévě. Autor ve studii pouze uvádí, že hladké svalové buňky migrovaly do scaffoldu a jako nejúspěšnější uvádí materiál PLLA.

Vaz a kol. [23] vyrobil dvouvrstvý scaffold. Vnitřní vrstvu scaffoldu tvořila náhodně orientovaná mikrovlákna PCL (1,5-6  $\mu\text{m}$ ) s velikostí pórů asi 15  $\mu\text{m}$ . Struktura vláken obsahuje korálky. Vnější vrstvu tvoří orientovaná vlákna PLA o průměrech od 800 nm do 3  $\mu\text{m}$  a velikostí pórů do 10  $\mu\text{m}$ . Na těchto scaffoldech byly pěstovány fibroblasty. Po 1 týdnu buňky začínají proliferovat a po 2 týdnech některé buňky pronikají dovnitř scaffoldu. Po 30 dnech pokrývají již celý povrch. Buňky se nechají vést strukturou vláken, ovšem drží se spíše u povrchu scaffoldu.

Ju a kol. [25] zvlákňoval směs (1:1) PCL a kolagenu na kolektor o průměru 4,75 mm. Ve své práci připravil 4 druhy scaffoldů o různých průměrech vláken (od 0,27 do 4,45  $\mu\text{m}$ ) a zkoumal chování buněk na těchto strukturách. Autor uvádí, že nanovlákná jsou vhodná na pěstování buněk, ovšem zamezují jejich pronikání do scaffoldu, mikrovlákna infiltraci naopak umožňují. Dále se zaměřuje na morfologii endoteliálních buněk a ukazuje, že endotely pěstované na nanovláknách mají lépe vyvinutý cytoskelet a fokální adhezi, než endotely pěstované na mikrovláknách. Proto následně připravil dvouvrstvý scaffold, jehož vnitřní strana se skládá z nanovláken vhodných pro endotely a současně tvoří bariéru pro hladké svalové buňky. Vnější vrstva se skládala z mikrovláken, která umožňují pronikání hladkých svalových buněk do scaffoldu. Tento scaffold byl osázen hladkými svalovými buňkami a endoteliálními buňkami. Pokus dokazuje, že hladké svalové buňky pronikají do scaffoldu, zatímco endotely se drží na povrchu nanovlákněné vrstvy.

He a kol. ve své práci [43] použil k výrobě scaffoldu běžný postup elektrického zvlákňování a připravil scaffold z vláken PLCL (70:30). Vlákna byla náhodně orientovaná, jejich průměry nejsou v práci uvedeny. Z přiložených snímků lze usuzovat, že se jedná o vlákna od 0,5 do 1  $\mu\text{m}$ . Vlákna byla dále potažena vrstvou kolagenu, pro zajištění lepší biokompatibility. Vnitřní vrstva scaffoldu byla dále posázena endotely. Studie ukazuje, že již první den se většina buněk uchytila na povrchu vláken a vytvořila nerovnoměrnou vrstvu. Buňky během 7 dní pokryly celý povrch scaffoldu rovnoměrnou vrstvou. Navíc nedošlo k žádné infiltraci buněk do scaffoldu, což je u endotelů žádoucí.

Tillman a kol. [5] testoval nanovlákněné scaffoldy připravené ze směsi PCL a kolagenu. Na scaffoldech byly kultivovány endoteliální buňky (na vnitřní stěně) a hladké svalové buňky

(na vnější stěně) po dobu 9 dní. Kultivace probíhala v reaktoru, který zprostředkoval pulzující, proudící prostředí. Endotely vytvořily rovnoměrnou vrstvu na povrchu scaffoldu. U scaffoldů byla testována odolnost jejich povrchu proti adhezi krevních destiček. Testy ukazují, že scaffoldy s vrstvou endotelů (na rozdíl od scaffoldů neosázených) vykazují naprosto minimální adhezi. Scaffoldy byly dále implantovány králíkům na dobu 1 měsíce. Všechny cévní náhrady si zachovaly průchodnost i průměr a jejich mechanické vlastnosti zůstávají i 1 měsíc po implantaci srovnatelné s vlastnostmi přírodní cévy. Vzorky nevyvolávají žádnou zánětlivou reakci, přestože infiltrace buněk po jednom měsíci je zcela minimální.

He a kol. [43] implantoval scaffold připravený z nanovláken PLCL králíkům. Po 7 týdnech si zachoval strukturní integritu i průchodnost. Organismus však na implantát reagoval jako na nepřátelskou tkáň a nedošlo k žádné buněčné infiltraci. Na lumenu nedošlo k žádnému srážení krve po celých 7 týdnech, implantáty si zachovaly průchodnost. Test dále ukazuje, že scaffold bylo možné bez problémů napojit na původní cévu a nedocházelo k průsaku krve.

## 2.5. Střídavé elektrické zvlákňování

Během poslední dekády vzniklo na toto téma jen poměrně málo prací, v porovnání s pracemi na téma stejnosměrného zvlákňování. Přesto se jedná o velmi zajímavou technologii, která by mohla být v budoucnu velice užitečná. Autorem jedné z prvních prací, které se zabývají přímo střídavým zvlákňováním je Kessick a kol. [13]. Kessick provedl srovnání stejnosměrného (DC) a střídavého (AC) elektrospinningu při zvlákňování polyethylenoxidu z jehly s použitím standartního kolektoru, tak jak je to běžné pro DC zvlákňování. Kessick zde upozorňuje na výrazně zredukovanou oblast bičující nestability.

Maheshwari [15] ve své práci popisuje AC zvlákňování z jehly s kolektorem (opět, podobné uspořádání, jako u DC elektrického zvlákňování). Uvádí, že vzniká vlákno, které není ke kolektoru nijak přitahováno, ani není nijak ovlivňováno jeho tvarem. S vláknem se dá ručně manipulovat, případně navíjet. Toto vlákno je složeno z různě propletených nanovláken. Maheshwari se dále zaměřuje na závislost procesu na hodnotách frekvence a napětí. Uvádí, že při zvýšení napětí se vlákno rozšiřuje a narůstá počet jednotlivých nanovláken. Frekvence má přesně opačný efekt. Pro zvlákňování byly použity jen velice nízké hodnoty napětí – asi do 5 kV.

Pokorný a kol. [4] přispěl k výrazné inovaci této technologie, nahrazením jehly zvlákňovací elektrodou v podobě kovové tyčky, do které je polymer dávkován spodem ze zásobníku v podobě injekční stříkačky. Pro zvlákňování dále použil výrazně vyšší napětí než předchozí autoři. Jako optimální zvlákňovací napětí pro polyvinyl butyral a polyakrylonitril uvádí hodnoty kolem 30 kV. Dále zcela vyřazuje elektricky aktivní kolektor – uvádí, že kolektor nemá na proces zvlákňování žádný vliv. Autor zavádí hypotézu existence virtuální elektrody, která se opakovaně tvoří v naprosté blízkosti zvlákňovací elektrody a skládá se z elektricky nabitých nanovláknenných segmentů. To je znázorněno na obrázku 5c)

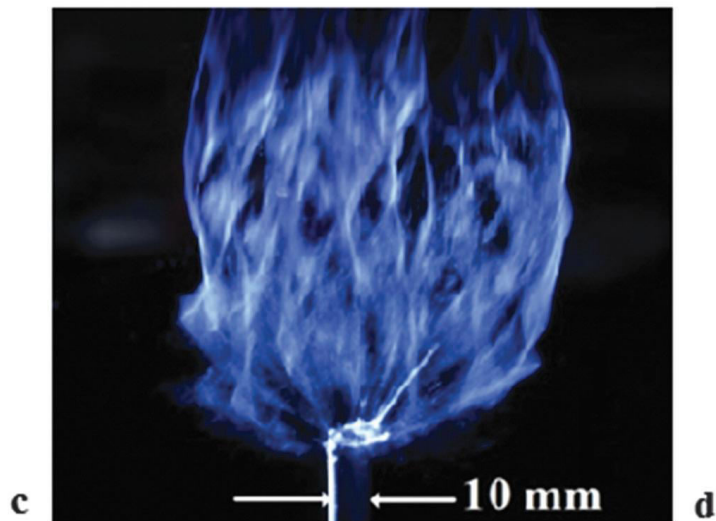
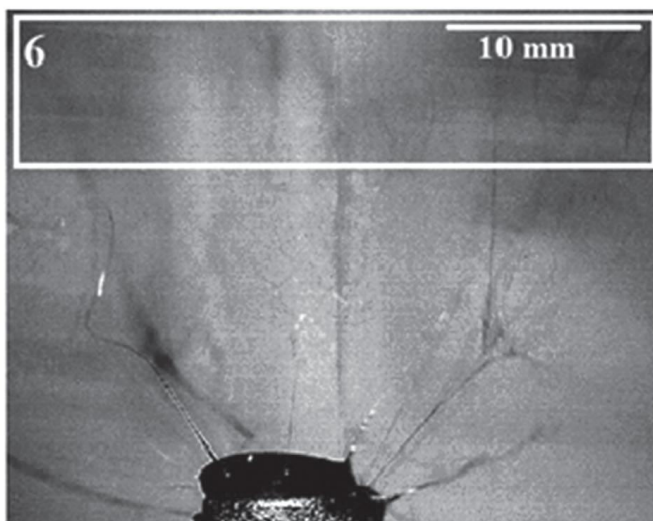
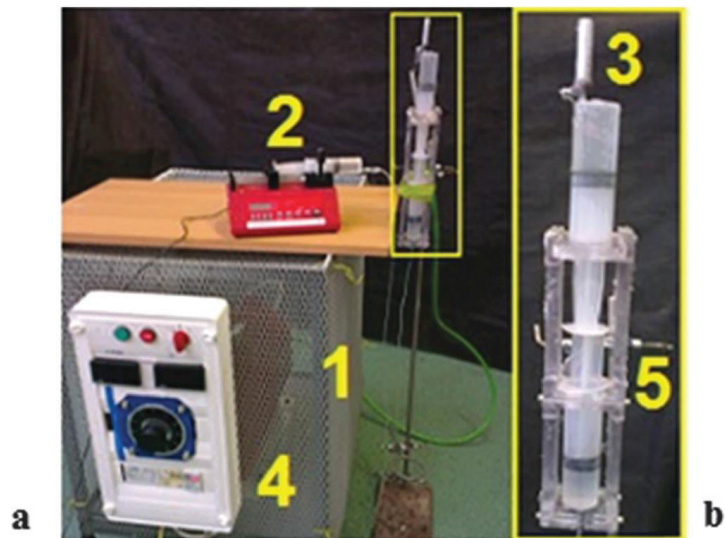
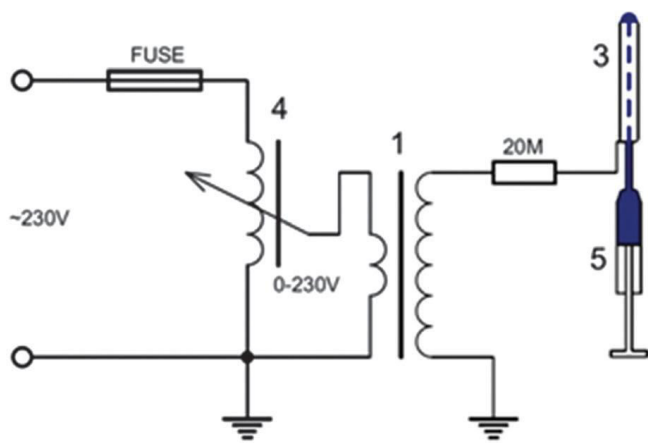
Pomocí vysokorychlostní kamery se podařilo zachytit vznik trysek i chování samotného procesu. Autor zde uvádí hustoty trysek v řádu jednotek na  $\text{mm}^{-2}$ , což je o řád více, než u DC elektrospinningu. Tomu také odpovídá objem polymeru dodávaného na elektrodu, který je ve srovnání s DC elektrospinningem opět asi o řád vyšší.[4]

Nanovláknenná vlečka (obrázek 5d) je unášena od kolektoru působením elektrického větru. Ten brání, aby nově vzniklá vlákna během opačně nabitě půlvlny, kdy získá elektroda opačnou polaritu, byla opět přitáhnutá ke kolektoru. Náboj vláken místo toho zrekombinuje s

nábojem vláken z předchozí pŕlvlny. Vlákna jsou odnášena pryč elektrickým větrem rychlostí asi 0,25 až 0,6 m/s. Tento mechanismus zajišřuje kontinuitu celého procesu. Jelikož jsou vyrobená vlákna elektricky neutrální, autor navrhuje stáčení do přize, nebo navíjení na válcovitý kolektor. [4]

### 2.5.1. Aparatura pro střídavé elektrické zvlákňování

Obrázek 4 znázorňuje schéma aparatury pro AC zvlákňování podle Pokorného [4]. Aparatura se skládá ze zvlákňovací elektrody (3) - jako zvlákňovací elektroda slouží hliníková tyčka s kanálkem pro přívod polymeru. Polymer je dávkován z injekční stříkačky, která je ovládána pomocí hydraulického převodního systému (5), který zajišřuje izolaci dávkovací pumpy (2). Převodní systém tvoří 2 injekční stříkačky uchycené v polykarbonátovém držáku, postavené písty naproti sobě. Jedna z injekčních stříkaček je naplněna polymerem a připojena na zvlákňovací elektrodu. Druhá je naplněna vodou a je připojena hadičkou k dávkovací pumpě. Zvlákňovací elektroda je připojena vodičem na zdroj vysokého napětí - transformátor (1) a variabilní transformátor (4). Autor uvádí, že tato sestava generuje maximální efektivní napětí 30 kV o frekvenci 50 Hz. Aparatura pracuje bez elektricky aktivního kolektoru.



Obrázek 4: Schéma (a) a snímek (b) aparatury pro střídavé elektrické zvlákňování. Aparatura se skládá ze zvlákňovací elektrody (3), na kterou je dávkován polymer z injekční stříkačky. Ta je ovládána pomocí hydraulického systému (5), který zajišťuje izolaci dávkovací pumpy (2). Zvlákňovací elektroda je připojena vodičem na zdroj vysokého napětí - transformátor (1) a variabilní transformátor (4), který umožňuje regulaci napětí. Obrázek (c) ukazuje zónu tvorby nanovláken. Nanovláknna se tvoří mezi zvlákňovací elektrodou a virtuální protielektrodou (6). Obrázek (d) ukazuje nanovláknennou vlečku, která vzniká při AC elektrickém zvlákňování.[4]

### 2.5.2. Střídavé elektrické zvláknování pro biologické aplikace

Vzhledem k tomu, že AC elektrospinning je zatím ještě relativně nová technologie, bylo s ní zvlákněno jen velice omezené množství polymerů. Stejně tak existují zatím jen velice omezené znalosti o vlastnostech zvlákněných materiálů a dalších možnostech této technologie. Tuto mezeru je tedy třeba vyplnit a získat další informace.

Lawson a kol. [44] touto technologickou cestou jako první zvláknil biodegradabilní polykaprolakton. Použil alternativní rozpouštědlový systém - kyselinu octovou jako rozpouštědlo a acetát sodný pro zvýšení vodivosti roztoku. Z roztoků PCL o různých koncentracích připravil vlákna s průměry od 150 nm do 2  $\mu\text{m}$ . Ukazuje zde lineární závislost průměrů vláken na napětí a koncentraci a důležitost vodivosti roztoku, kterou zde zprostředkovává acetát sodný o různých koncentracích.

### 3. Experimentální část: Alternativní rozpouštědla pro elektrické zvláknování PCL

Polykaprolakton je semikrystalický lineární hydrofobní polymer se širokým uplatněním v biomedicínských aplikacích. Ve srovnání s ostatními polyestery (PLA, PLG, PLGA) je rychlost jeho degradace značně nižší. Díky tomu je PCL jedním z nejvíce preferovaných syntetických polymerů pro biomedicínské aplikace. Biokompatibilita a dlouhodobá stabilita po implantaci jsou klíčové aspekty vedoucí k jeho použití pro nanovláknenné cévní tkáňové nosiče.

Přestože existuje mnoho různých rozpouštědel pro PCL, mnoho z nich je toxických (dimethylformamid, tetrafluoretylen, metylen chlorid, dichloreten, pyridin). Jedním z nejpreferovanějších rozpouštědel, je chloroform a to právě díky jeho nízké toxicitě. Na druhou stranu zvláknováním roztoku PCL v chloroformu je možné připravit pouze mikroválkna od 2 do 5  $\mu\text{m}$  [10]. Proto je třeba prozkoumat další rozpouštědlové systémy, které by umožnily výrobu nanovláken bez ztráty biokompatibility tohoto materiálu. Tato část se tedy zaměřuje na přípravu nanovláken elektrickým zvláknováním roztoků PCL ve směsi chloroformu, etanolu, kyseliny mravenčí a octové a jejích cílem je připravit nanovláknenný polykaprolakton, který by bylo možné použít jako vnitřní vrstvu cévních tkáňových nosičů.

#### 3.1. Materiály a metody

##### 3.1.1. Chemické látky a roztoky

Polykaprolakton (PCL, Mn 45000, Sigma Aldrich) byl rozpuštěn v roztoku chloroformu (Sigma Aldrich) a etanolu (Sigma Aldrich) v poměru 9:1 v koncentracích 14, 16, 18 s 20 w/w%. Dále byly připraveny roztoky 18 w/w% PCL v chloroformu a etanolu v poměru 9:1, ke kterým bylo zvlášť přidáno malé množství (20  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$ , 80  $\mu\text{l}$  a 120  $\mu\text{l}$ ) kyseliny mravenčí (FA, 99%, Sigma Aldrich) a kyseliny octové (AA, 99,98%, Sigma Aldrich). Nakonec byl připraven 18% roztok PCL v kyselině mravenčí a PCL v kyselině octové. Roztoky byly míchány 8 hodin a poté zvlákněny, aby nedošlo k degradaci PCL [10]. Etanol v roztoku zpomaluje vypařování chloroformu a zlepšuje zvláknitelnost [10]. Přehled všech připravených vzorků je zobrazen v tabulce 1.



Tabulka 1: Přehled zvlákněných roztoků PCL s různými rozpouštědlovými systémy

Označení vzorku	PCL/chloroform: etanol (9:1 – w/w%) [w/w %]	Přídavek FA [μl]	Přídavek AA [μl]	FA [w/v %]	AA [w/v %]
C14	14	-	-	-	-
C16	16				
C18	18				
C20	20				
C18FA20	18	20	-	-	-
C18FA40		40			
C18FA80		80			
C18FA120		120			
C18AA20	18	-	20	-	-
C18AA40			40		
C18AA80			80		
C18AA120			120		
FA18	-	-	-	18	-
AA18	-	-	-	-	18

### 3.1.2. Elektrické zvláknování

Zvláknování na aparatuře pro elektrospinning (Nanospinner, Inoveso, Turecko, obrázek 5) probíhalo horizontálním směrem. Vzdálenost mezi zvláknovací elektrodou a kolektorem byla 20 cm a průměr zvláknovací jehly 0,8 mm. Dávkování, napětí a doba zvláknování se pohybovaly v rozmezí 0,4 – 1 ml/h, 12-15 kV a 10-20 minut, v závislosti na použitém rozpouštědle.



Obrázek 5: Aparatura použitá k elektrickému zvlákňování.

### 3.1.3. Charakterizace vzorků

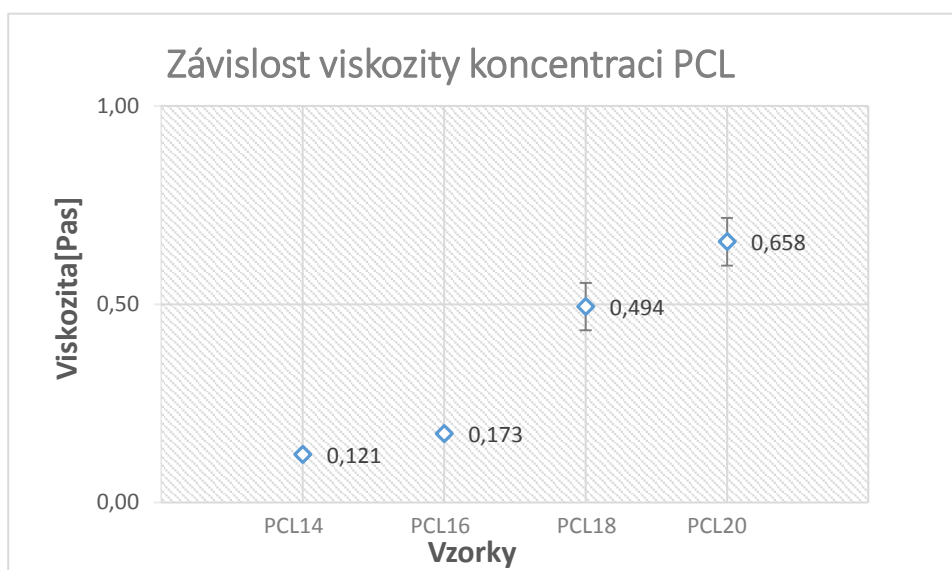
Viskozita roztoků byla měřena na viskozimetru HAAKE RotoVisco 1 (Thermo Scientific) spárovaném se softwarem Rheowin 4 Job Manager a Rheowin Data Manager. Měření probíhalo při teplotě 24°C při otáčkách od 10 do 4000 RPM pro dobu 90 sekund. Vodivost vzorků byla měřena pomocí konduktometru (Chromservis, Eutchen Instruments, NOC 510) se skleněnou sondou vhodnou pro měření těchto roztoků.

Pro charakterizaci morfologie vzorků byl použit elektronový mikroskop ZEISS EVA, MO10. Průměry byly měřeny z minimálně 100 vláken pro každý z 5 snímků. Technikou prahování (program ImageJ) byla dále změřena porozita vzorků. FTIR (Perkin Elmer, Spektrum Two Model FTIR) analýza byla provedena pro ověření přítomnosti zbytkového rozpouštědla.

## 3.2. Výsledky

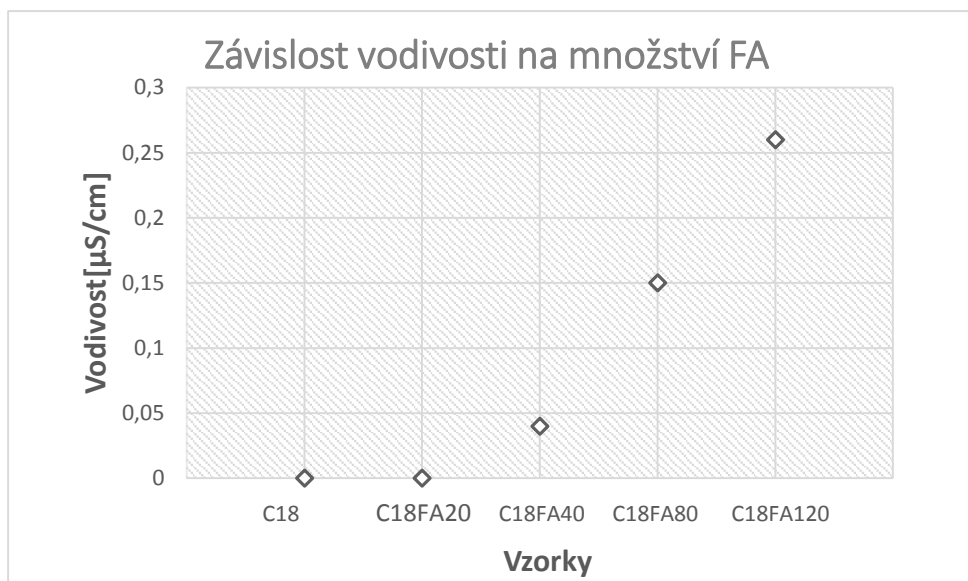
### 3.2.1. Vlastnosti roztoků

Vodivost roztoků je určena především typem polymeru, rozpouštědla a přítomných solí. Vodivost samostatných rozpouštědel použitých v této práci byla 0,00  $\mu\text{S/m}$ , 0,00  $\mu\text{S/m}$ , 0,65  $\mu\text{S/m}$  a 230  $\mu\text{S/m}$  pro chloroform, kyselinu octovou, etanol a kyselinu mravenčí. Z literatury je také známo, že kyselina octová má velice nízkou polaritu, tedy je nevodivá, pokud není smísená s vodou, nebo jinou vodivou látkou. Na druhou stranu, kyselina mravenčí je silně polární [41]. Graf 1 ukazuje závislost viskozity roztoků na koncentraci PCL. Vodivost těchto vzorků byla 0,00  $\mu\text{S/m}$ .

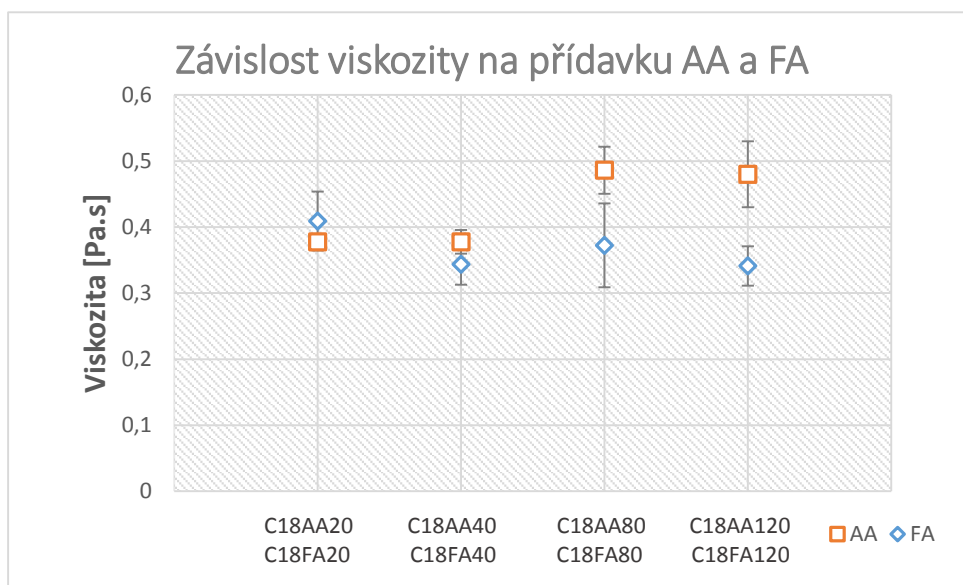


Graf 1: Změna viskozity roztoku v závislosti na koncentraci PCL

Přidáním kyseliny octové do roztoku nedošlo ke změně vodivosti roztoku, na rozdíl od kyseliny mravenčí (Graf 2). Přidáním kyseliny mravenčí ani kyseliny octové do roztoků nedošlo ke změně viskozity roztoku. (Graf 3).



Graf 2: Vliv přidané kyseliny mravenčí na vodivost roztoku PCL

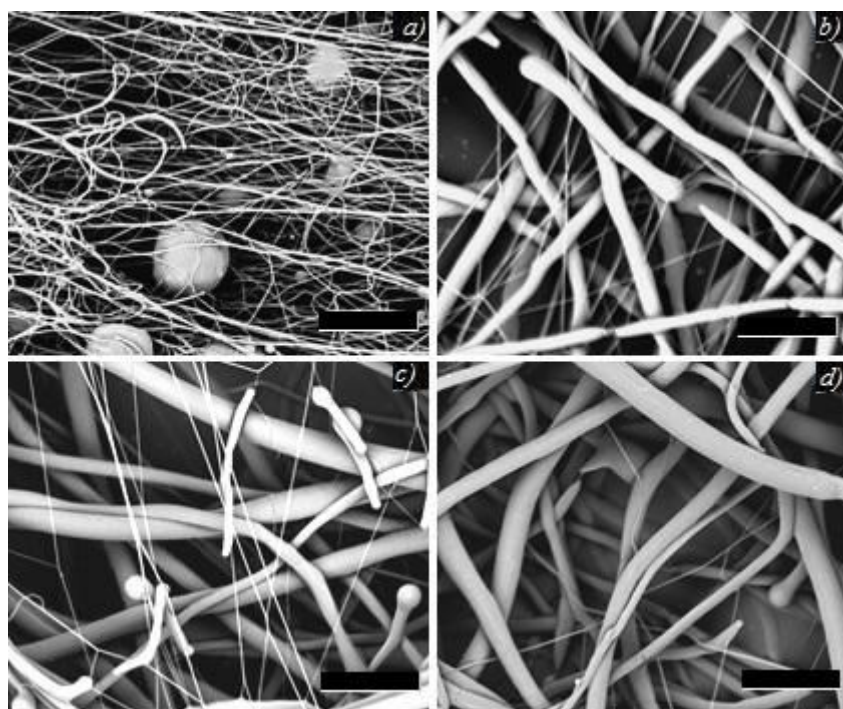


Graf 3: vliv AA a FA na viskozitu roztoku PCL

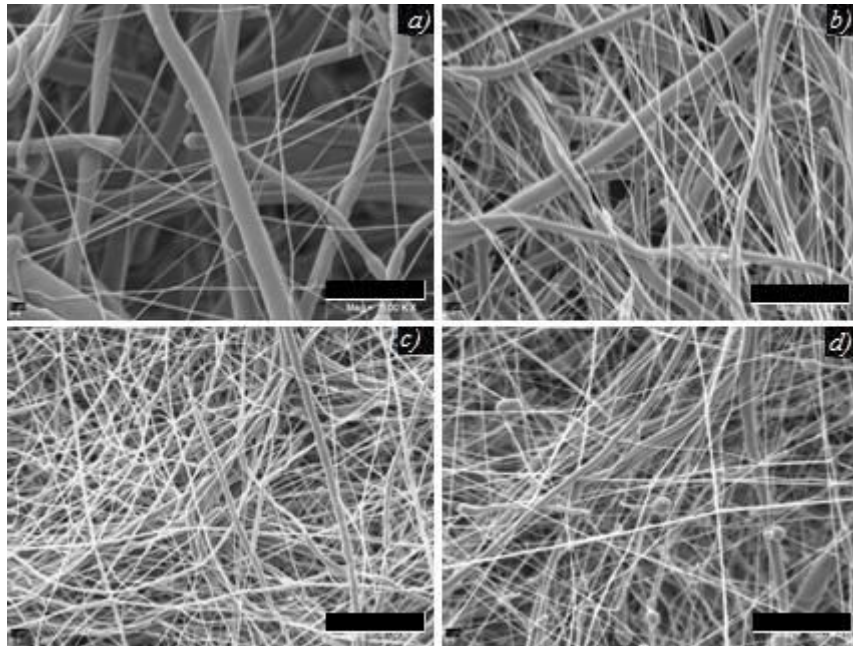
Elektrická vodivost a viskozita 18% PCL rozpuštěného v AA a FA byly 0,00 a  $\mu\text{S}/\text{m}$  a 88,9  $\mu\text{S}/\text{m}$ , 0,142 Pa·s a 0,041 Pa·s. Zvláknitelnost roztoků AA18 a FA18 byla velmi špatná, nepodařilo se dosáhnout vlákněné struktury. Důvodem může být nízká viskozita roztoků [40].

### 3.2.2. Morfologie vláken

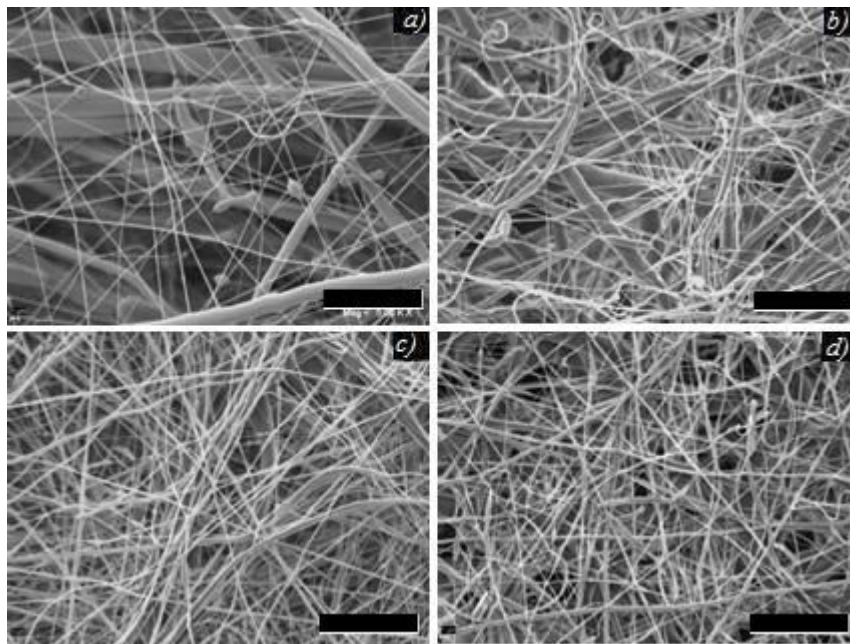
Snímky SEM vlákněných vrstev připravených z roztoků C14, C16, C18 a C20 ukazuje obrázek 6. Obrázky 7 a 8 zobrazují snímky PCL připravené z roztoků, do kterých byla přidána AA a FA.



*Obrázek 6: SEM snímky vlákněných vrstev připravených při ze vzorků C14, C16, C18, C20. Měřítko odpovídá 3  $\mu\text{m}$ .*



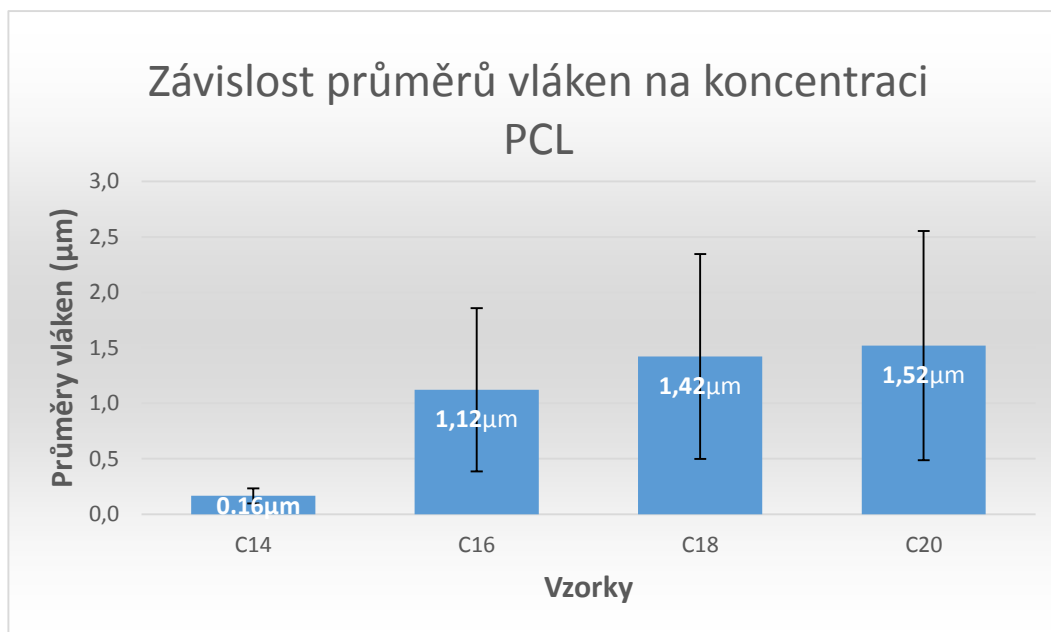
Obrázek 7: SEM snímky vzorků a) C18AA20, b) C18AA40, c) C18AA80 a d) C18AA120.  
Měřítka odpovídá 3  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 8: SEM snímky vzorků a) C18FA20, b) C18FA40, c) C18FA80 a d) C18FA120.  
Měřítka odpovídá 3  $\mu\text{m}$ .

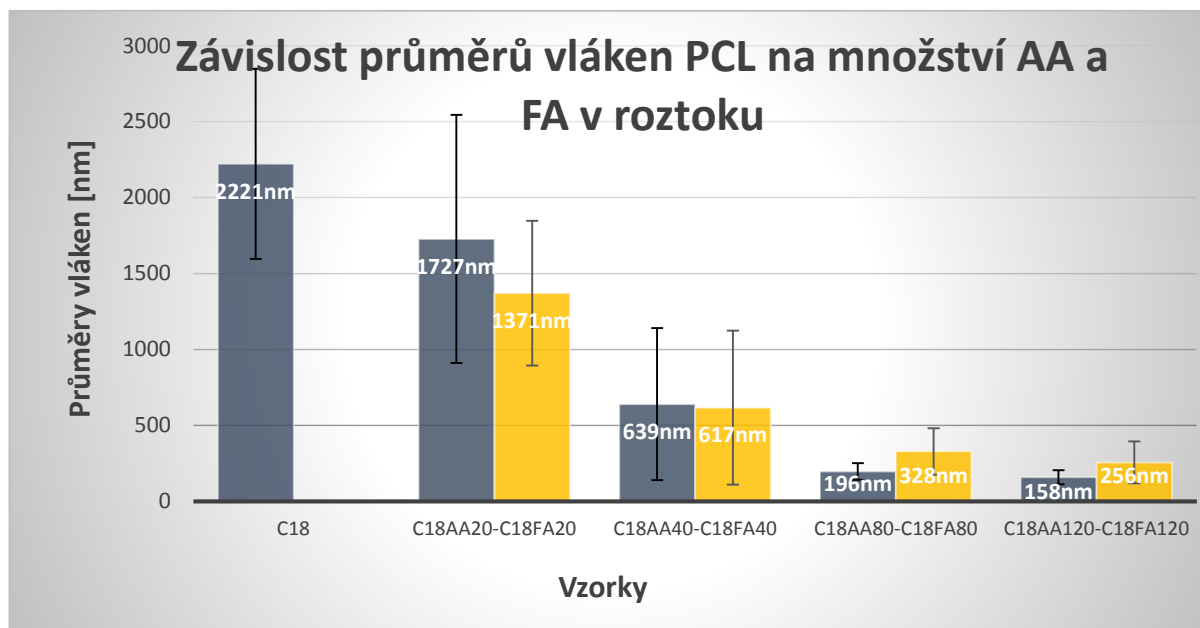
### 3.2.3. Výsledky měření průměrů vláken

Vláknenné vrstvy připravené z PCL v chloroformu a etanolu vykazují mikrovláknennou strukturu, kromě C14. Přestože vzorek C14 je složen z nanovláken, obsahuje také korálky (obrázek 6a). Graf 4 ukazuje, že průměr vláken se zvyšuje se zvyšující se koncentrací PCL. U některých vzorků byly zastoupeny 2 skupiny průměrů vláken – to je důvodem vysoké směrodatné odchylky.



Graf 4: Závislost průměrů vláken na koncentraci PCL

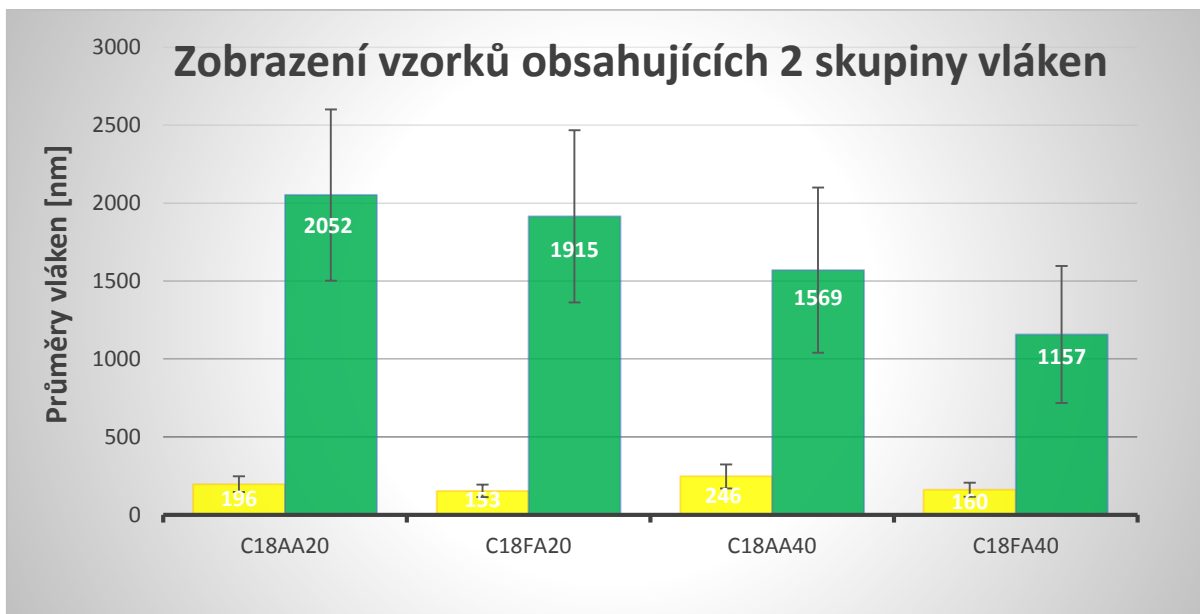
Graf 5 zobrazuje závislost průměrů vláken vzorků 18% PCL na množství AA a FA. Výsledky ukazují v obou případech snižování průměrů vláken. Nejjemnější vlákna obsahují vzorky AA4 a AA6 (196 nm; 158 nm). Vzhledem k tomu, že nedošlo k žádné změně viskozity ani u jednoho ze vzorků, zdá se, že důvodem snižování průměru vláken u kyseliny octové může být způsobeno snížením povrchového napětí. Tento předpoklad je třeba ověřit dalším měřením. U vzorků s FA má vliv také zvýšení vodivosti roztoku.



Graf 5: Závislost průměrů vláken na množství AA a FA v roztoku

Ze snímků SEM vzorků C18AA20, C18FA20, C18AA40 a C18FA40 je dále vidět, že struktura obsahuje různé vlákenné skupiny (nanovlákná a mikrovlákna), což potvrzuje i obrazová analýza. To se pak silně projevuje u směrodatné odchylky. Proto byly tyto dvě skupiny vyhodnoceny zvlášť. Ve vzorku C18AA20 jsou tedy zastoupená nanovlákná (196 nm) a mikrovlákna (2,05  $\mu\text{m}$ ). Pro vzorek C18FA20 je to 153 nm and 1,92  $\mu\text{m}$ . Pro vzorek C18AA40 je to 246 nm a 1,57  $\mu\text{m}$  a pro C18FA40 160 nm/1,16  $\mu\text{m}$ . Výsledky znázorňuje graf 6.

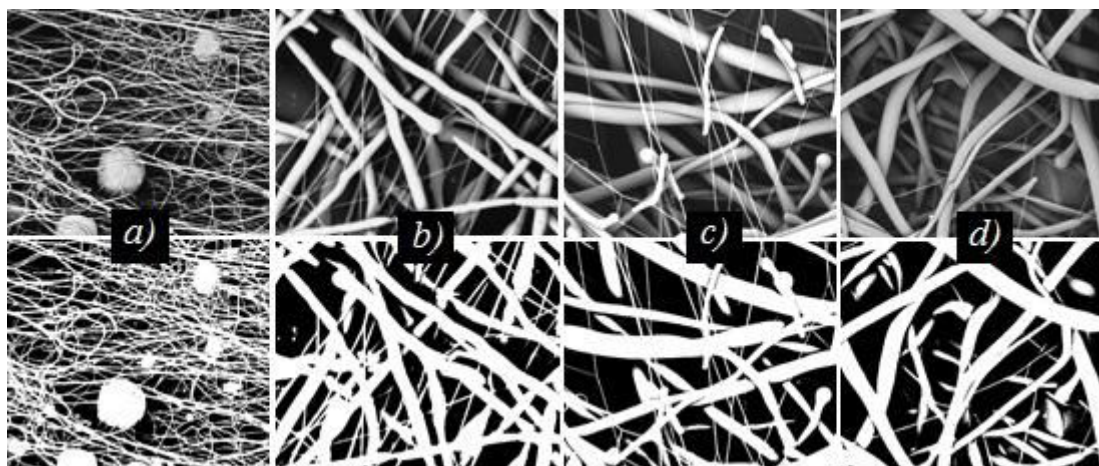




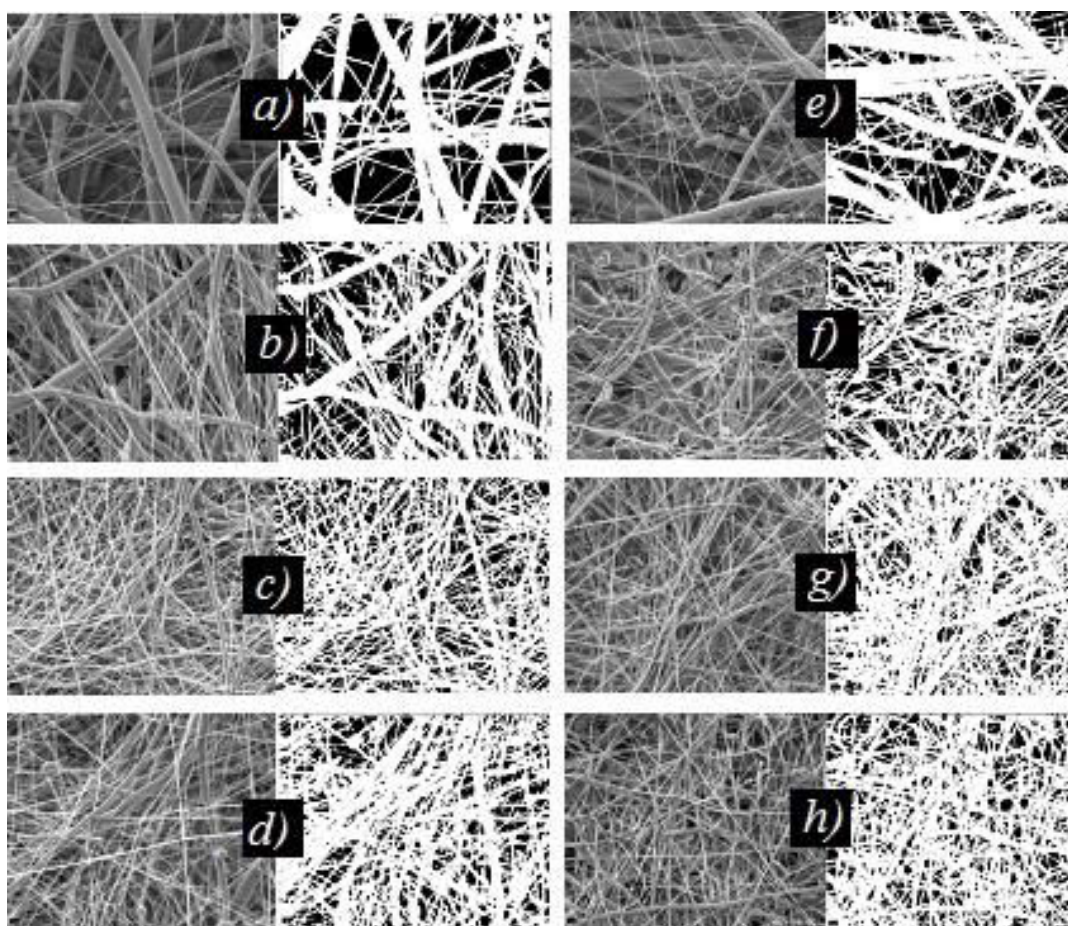
Graf 6: Zobrazení průměrových skupin vláken u vzorků C18AA20, C18AA40, C18FA20 a C18FA40

### 3.2.4. Měření porozity a velikosti pórů

Snímky SEM a jejich prahování ukazuje obrázek 9 a 10. Průměrnou velikost pórů a porozitu zobrazuje tabulka 2. Podle tabulky 2 lze říci, že velikost pórů závisí na průměrech vláken. To odpovídá i literatuře [17]. Výsledná velikost pórů pro vzorek C20 je téměř 100 větší, než u vzorků, ke kterým byla přidána kyselina. Podobnou tendenci má i porozita. Nutno poznamenat, že technika prahování má tendenci udávat vyšší hodnoty pro vzorky s většími průměry.



Obrázek 9: Snímky vzorků C14, C16, C18 a C20 a jejich prahování. Snímky jsou pořizeny při zvětšení 5000x.



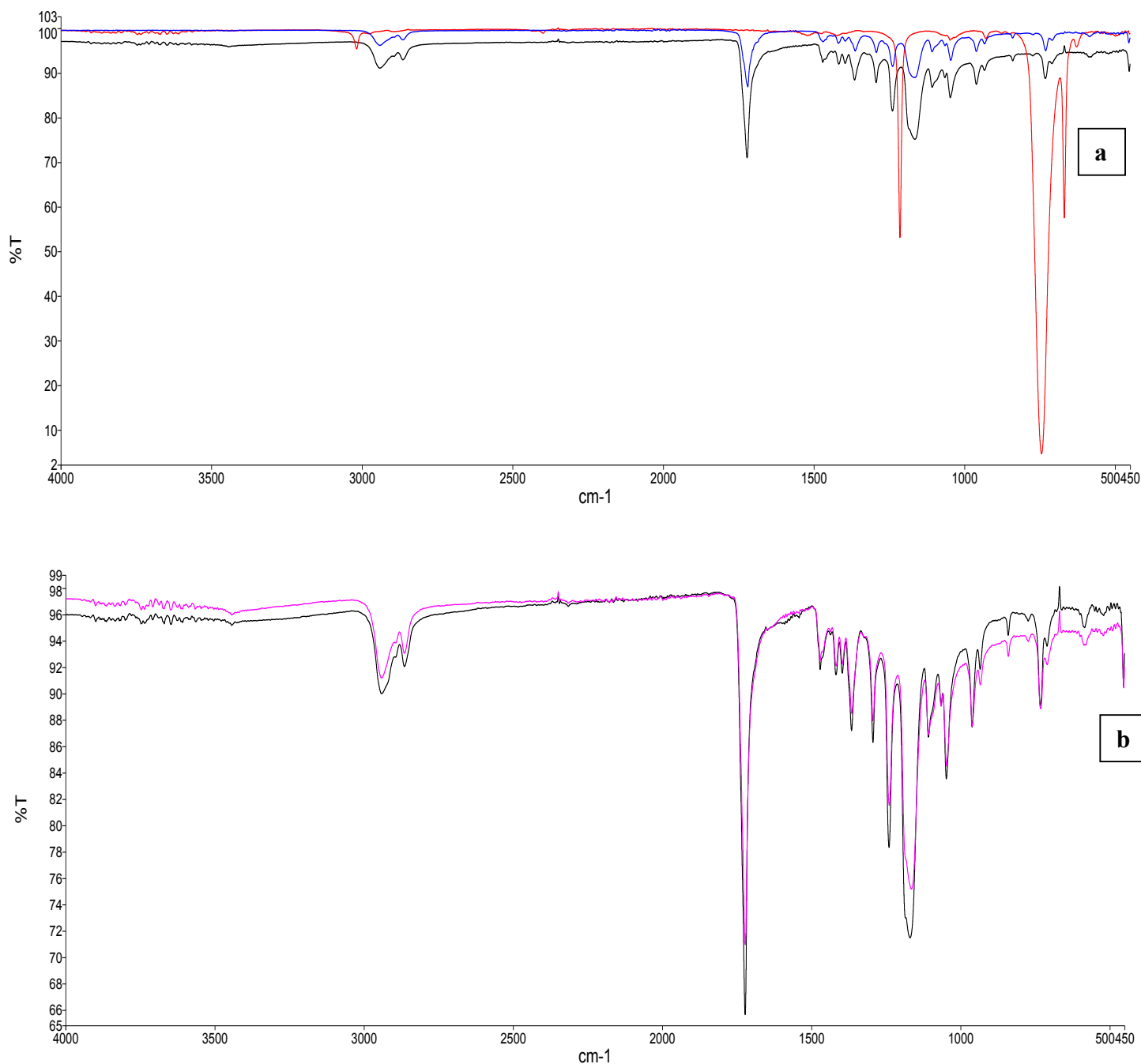
Obrázek 10: Sem snímky pro C18AA20 – C18AA120 (a, b, c, d) a snímky C18FA20 – C18FA120 (e, f, g, h) a jejich prahování. Snímky jsou pořízeny při zvětšení 5000x.

Tabulka 2: Porozita a průměrná velikost pórů

Označení vzorku	Průměrná velikost pórů [ $\mu\text{m}^2$ ]	Porozita [%]
C20	20.38±4,01	56.82±4,74
C18	10.21±5,12	56.69±2,63
C16	5,74±1,56	44.2±3,04
C14	0,38±0,02	33.82±2,09
C18FA20	1.21±0.19	33.84±2,01
C18FA40	0.34±0.02	31.52±0,05
C18FA80	0.23±0.03	20.60±1,69
C18FA120	0.26±0.03	23.49±1,18
C18AA20	2.58±0,35	42.52±6,05
C18AA40	0.38±0,01	23.83±1,02
C18AA80	0.21±0,04	24.20±0,09
C18AA120	0.29±0.02	24.34±0,02

### 3.2.5. FTIR analýza

Graf 7 ukazuje výsledky FTIR analýzy. Podle grafu 7a je vidět, že C18 má velice podobnou charakteristiku, jako PCL granulát a rozdílnou od chloroformu. Obrázek 7b ukazuje, že vzorky C18 a C18AA120 mají podobný charakter. Není tedy přítomno zaznamenatelné množství kyseliny octové. Stejně tak nebyly nalezeny žádné píky charakteristické pro chloroform.



Graf 7: FTIR analýza vzorků. Na grafu a) je zobrazen vzorek C18 (černá křivka), chloroform (červená křivka), PCL ve formě granulátu (modrá křivka). V grafu b) je vzorek C18AA120 (černá křivka) a vzorek C18 (fialová křivka).

## 4. Experimentální část: Příprava nanovláknenného tkáňového nosiče AC elektrickým zvlákňováním

Střídavé elektrické zvlákňování je stále ještě poměrně nová technologie. Začala se rozvíjet teprve v posledním desetiletí. V oblasti tkáňového inženýrství má tato technologie jasný potenciál. Důvodem je především to, že vlákna tvořená touto technologií tvoří volnější strukturu, než vlákna připravená DC elektrospinningem. Teprve nedávno se však podařilo touto technologií zvláknit biodegradabilní PCL (Lawson, 2016, [44]). Je tedy zřejmé, že je třeba tuto technologii dále rozvíjet a využít její potenciál v oboru tkáňového inženýrství.

Tato část popisuje výrobu nanovláknenných tkáňových nosičů touto technologií. Pro výrobu vzorků byl použit PCL a jako rozpouštědlový systém kyselina octová a octan sodný [44]. Vzorky byly sbírány na rotační kolektor pro trubicovitěho tvaru a také pro dosažení orientované vláknenné struktury. U vzorků byla dále provedena obrazová analýza a testy mechanických vlastností.

### 4.1. Materiály a metody

Polykaprolakton (PCL, Sigma Aldrich) byl rozpuštěn v bezvodé kyselině octové (Sigma Aldrich), v koncentracích 10, 15 a 20 % w/v a dále byl přidán octan sodný (NaAc, LACHEMA) o koncentraci od 0,5 do 3 %. Roztoky byly míchány přes noc při teplotě 40 °C. U roztoků byla dále změřena viskozita na viskozimetru HAAKE RotoVisco 1 firmy Thermo Scientific, který byl spárován se softwarem Rheowin 4 Job Manager a Rheowin 4 Data Manager. Vzorky byly měřeny při rychlosti 1000 RPM po dobu 120s.

Zvlákňování probíhalo na aparatuře pro střídavé zvlákňování (která je podrobně popsána v kapitole 2.5.1, případně [4]) při vlhkosti od 61 do 82 % za použití napětí od 20 do 38 kV. Dávkování polymeru se pohybovalo od 3 do 8 ml/min, v závislosti na vlastnostech použitých roztoků. Pro zvlákňování byla použita zvlákňovací elektroda o vnějším průměru 6 mm a výšce 5 cm, do které byl přiváděn polymer z polypropylenové injekční stříkačky. Vzniklá vlákna byla manuálně sbírána na rotující nerezovou tyčku o průměru 6 mm, uchycenou ve vrtačce (Makita 6270D) při rychlosti rotace 0,37 m/s ve výšce asi 1 m nad zvlákňovací

elektrodou.

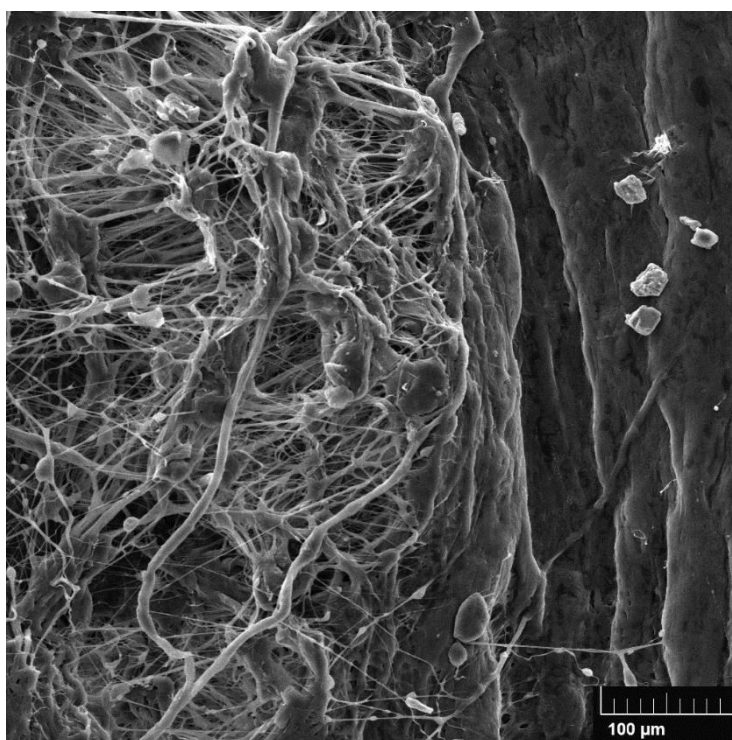
Takto připravené vzorky tkáňových nosičů byly dále charakterizovány. Vnitřní struktura vzorků byla zanalyzovaná pomocí elektronového mikroskopu (VEGA3 SEM, Tescan) a obrazová analýza byla provedena pomocí programu NIS-elements (LUCIA). Pro určení průměrů a jejich orientace bylo zahrnuto více než 250 různých vláken ze tří různých oblastí vzorku. Mechanické vlastnosti vzorků byly měřeny trhačkou typu LabTest 4.050 firmy LaborTech. Pro testování byly připraveny vzorky o rozměrech 1x1 cm. Vzdálenost čelistí trhačky byla nastavena na 0,5 cm a rychlost posuvu čelistí 2 mm/min. Z každého scaffoldu bylo takto připraveno 6 vzorků. Tři byly měřeny po směru orientace vláken a další 3 kolmo ke směru vláken. Pro měření tloušťky vzorků bylo použito mikrometrické měřidlo (Nova Technology s.r.o.).

## 4.2. Elektrické střídavé zvláknování roztoků

Při zvláknování se objevuje typická nanovláknenná vlečka, kterou je možné navíjet na kolektor. Vzorky s nižší koncentrací NaAc jsou zvláknitelné hůře, produkce vláken je nižší a nedochází k dostatečnému odpaření rozpouštědla, takže jsou výsledné vzorky vlhké a obsahují více či méně defektů (obrázek 9). Důvodem špatné zvláknitelnosti je nízká vodivost roztoků [44]. U roztoků s koncentrací 10 % se dále ukázalo, že lze dosáhnout lepších výsledků při použití nižšího napětí. Při vyšším napětí opět nedocházelo k dostatečnému odpařování rozpouštědla, což mělo negativní vliv na kvalitu vzorků. Přehled zvlákněných roztoků ukazuje tabulka 2. Na obrázku 9 je snímek tkáňových nanovláknenných vrstev.

Tabulka 2: Přehled zvlákněných roztoků

Označení vzorku	Koncentrace PCL	Koncentrace NaAc	Viskozita Pa·s	Napětí
PCL10/1	10%	1%	$0,31 \pm 0,05$	22 kV
PCL10/1,5	10%	1,5%	$0,35 \pm 0,05$	22 kV
PCL10/2	10%	2%	$0,39 \pm 0,01$	22 kV
PCL15/0,75	15%	0,75%	$1,29 \pm 0,16$	38 kV
PCL15/1,5	15%	1,5%	$1,36 \pm 0,12$	38 kV
PCL15/2,25	15%	2,25%	$1,52 \pm 0,06$	38 kV
PCL20/1	20%	1%	$3,12 \pm 0,22$	38 kV
PCL20/2	20%	2%	$3,31 \pm 0,08$	38 kV
PCL20/3	20%	3%	$3,41 \pm 0,1$	38 kV

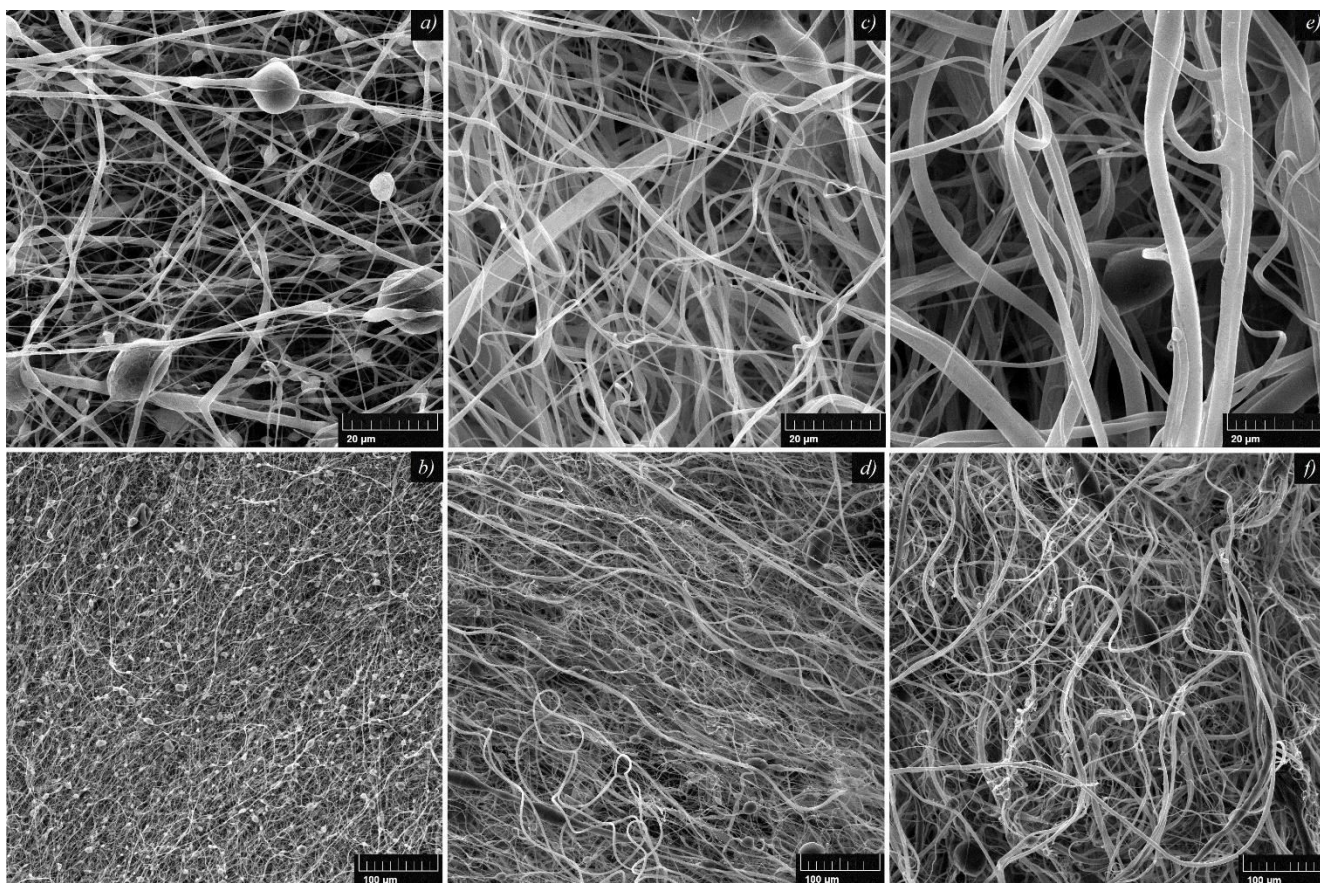


Obrázek 11: SEM snímek defektu vzniklého nedostatečným odpařením rozpouštědla

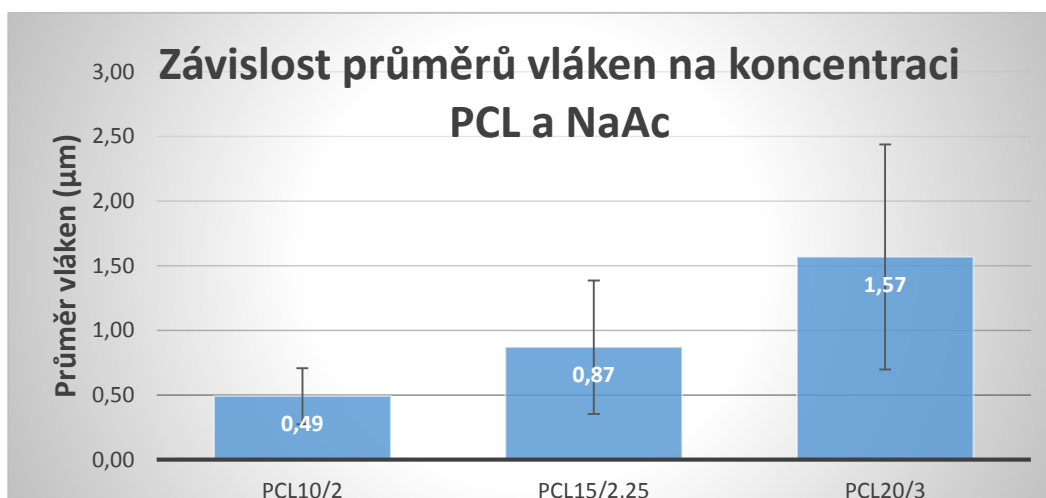
## 4.3. Výsledky

### 4.3.1. Morfologie vláken

Nejllepších výsledků bylo dosaženo se vzorky PCL10/2 (obrázek 10 a, b), PCL15/2,25 (obrázek 10 c, d) a PCL20/3 (obrázek 10 e, f). Vzorek připravený při 10 % (obrázek 10 a, b) obsahuje velké množství korálků o velikostech od 1 do 15  $\mu\text{m}$  s průměrnou hodnotou  $3,8 \pm 2 \mu\text{m}$ . U ostatních vzorků se korálky objevují spíše výjimečně. Vzorky PCL10/2 a PCL15/2,25 obsahují převážně nanovlákná a průměrech  $0,49 \pm 0,21 \mu\text{m}$  a  $0,87 \pm 0,51 \mu\text{m}$ . Vzorek PCL20/3 obsahuje mikrovlákná o průměrech  $1,57 \pm 0,87 \mu\text{m}$ . Střední hodnoty průměrů vláken přehledně zobrazuje graf 8.



Obrázek 12: SEM snímky vzorků PCL10/2 (a, b), PCL15/2,25 (c, d) a PCL20/3 (e, f)

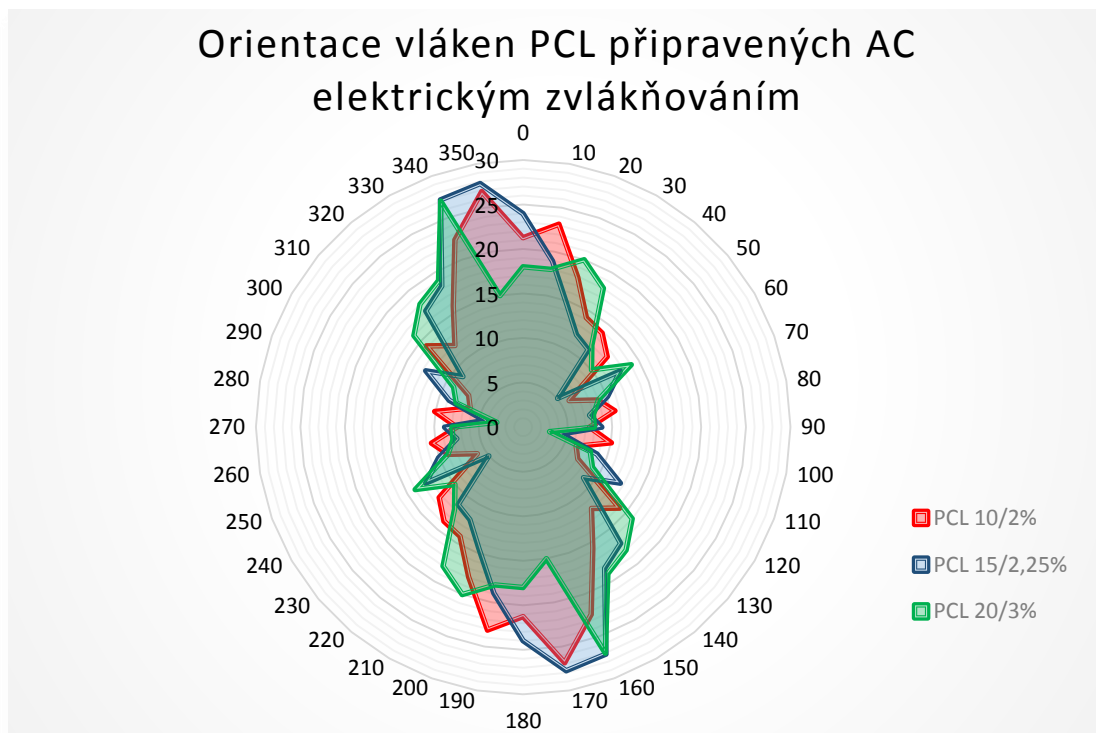


*Graf 8: Průměry vláken vzorků připravených z roztoků PCL10/2, PCL15/2,25 a PCL20/3. Ukazuje, že se stoupající koncentrací polymeru dochází k výraznému růstu průměrů vláken. Podobných výsledků dosáhl Lawson a kol. [44].*

#### 4.3.2. Orientace vláken

Nanovláknová vlnička vznikající při střídavém zvlákňování je tvořena mnoha vzájemně propletenými vlákny a tvoří tedy spleť, neuspořádanou strukturu [4]. Současně, jak je možné vidět na obrázku 10, vlákna připravená AC elektrospinningem jsou charakteristicky zkadeřená. Přesto z obrázku 10 můžeme vidět, že vlákna sbíraná na rotační kolektor mají orientovanou strukturu. Přesto je zřejmé, že si vzorky zachovávají volnou pórovitou vláknennou strukturu.

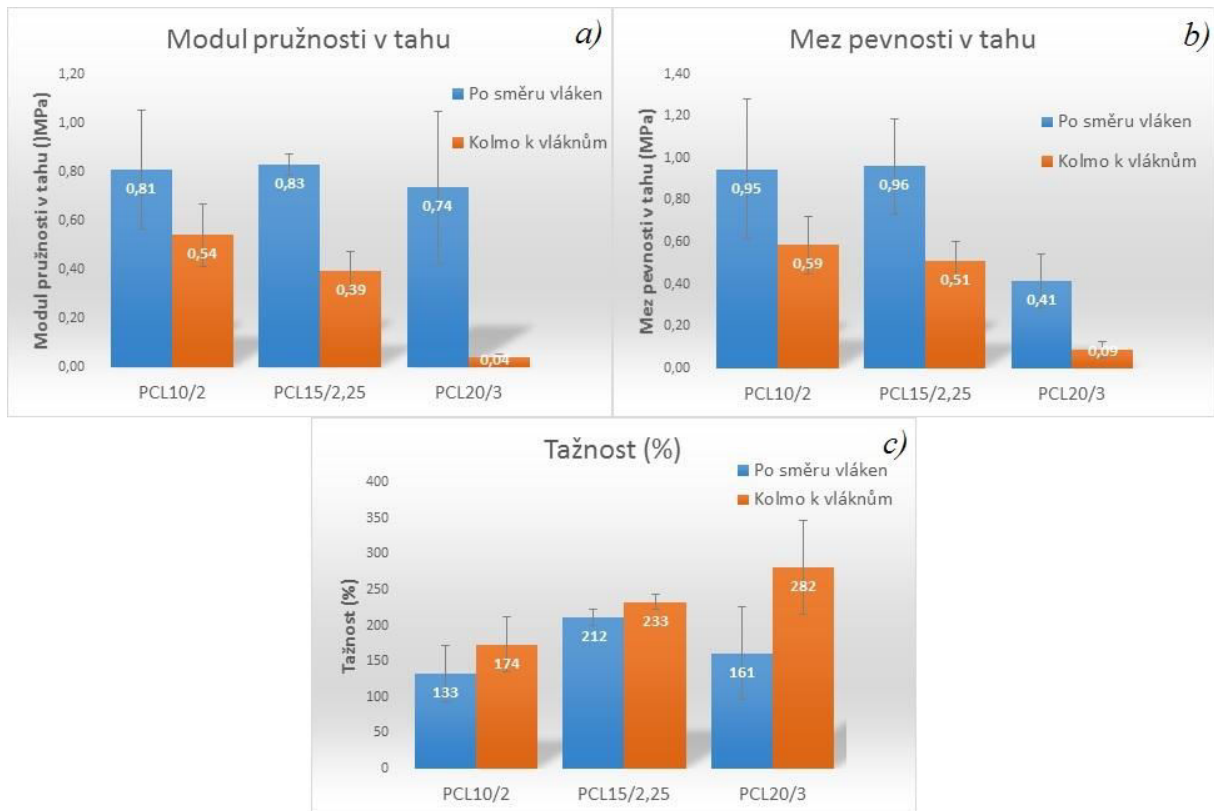




*Graf 9: Orientace vláken vzorků sbíraných na rotační válcový kolektor. Graf ukazuje, že všechny takto připravené vzorky vykazují podobný stupeň orientace vláken.*

#### 4.3.3. Mechanické vlastnosti

Graf 10 ukazuje výsledky mechanických zkoušek pro vzorky PCL10/2, PCL15/2,25 a PCL20/3 ve směru orientace vláken a ve směru kolmo k orientaci vláken. Vzhledem k malému počtu testovaných vzorků a tedy vysoké chybě měření, jsou výsledky spíše orientační. Přesto lze usuzovat, že orientace vláken ve vzorcích má vliv na jejich mechanické vlastnosti – především na modul pružnosti materiálu a mez pevnosti v tahu (Graf 10 a, b). Nejznatelnější rozdíl je u vzorků PCL15/2,25 a PCL20/3. U vzorku PCL20/3 je ovšem pravděpodobné, že došlo k nevhodné manipulaci při sundávání z kolektoru a tím k poškození jeho mechanických vlastností. Obecně se dá usuzovat, že modul pružnosti a mez pevnosti vzorků PCL10/2 a PCL15/2,25 je srovnatelná s hodnotami přírodní cévy [48], [49].



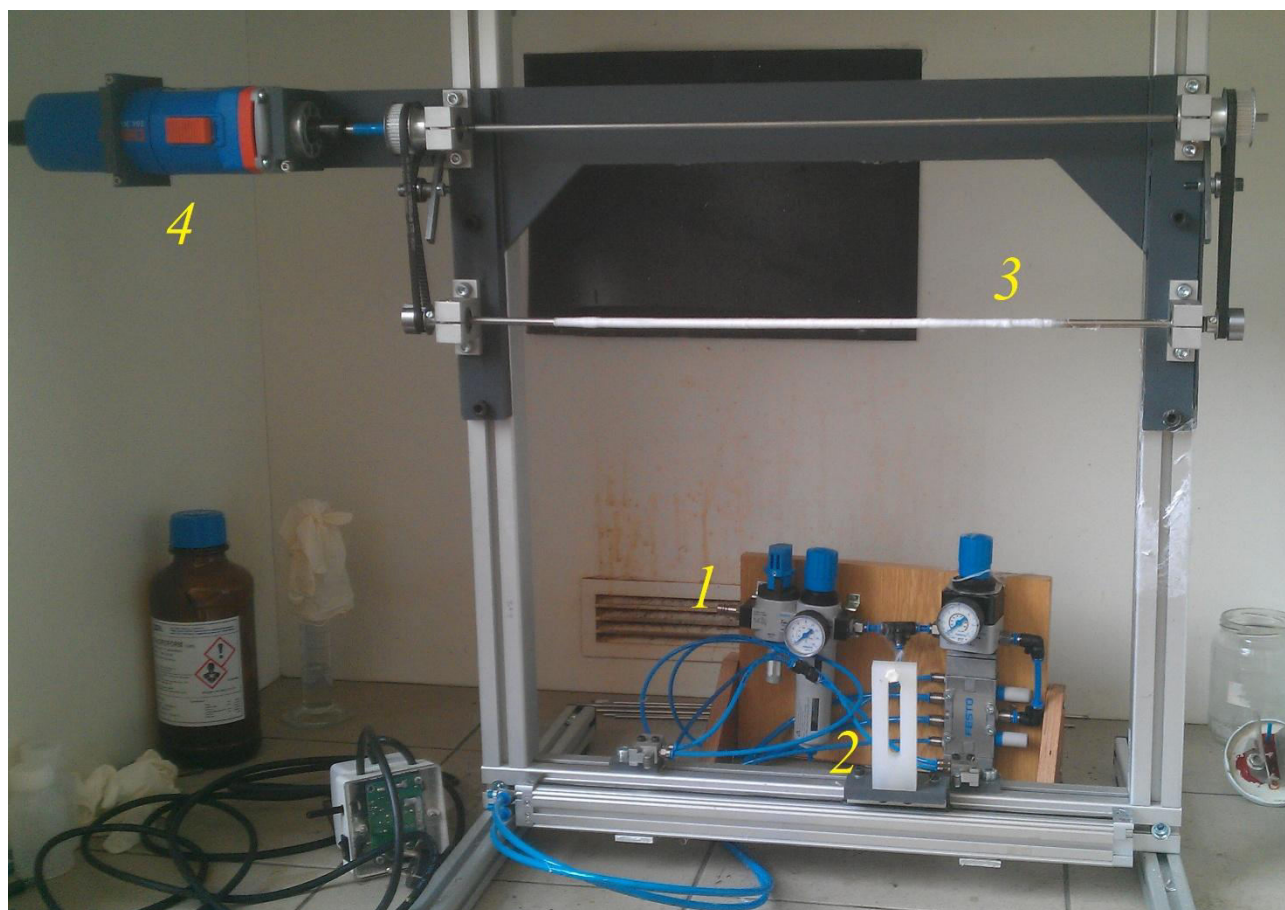
Graf 10: Mechanické vlastnosti vzorků pro různé orientace vláken.

#### 4.4. Návrh a konstrukce aparatury pro střídavé elektrické zvlákňování

Na základě předchozích měření byla navržena a vyrobena aparatura (Obrázek 11), která umožňuje rovnoměrný sběr vláken připravených střídavým elektrickým zvlákňováním. Aparatura je vybavena pneumaticky poháněným modulem (1), který umožňuje horizontální pohyb. Na tento modul (2) je možné připevnit zvlákňovací elektrodu. Na obrázku je dále vidět kolektor (3) o délce 50 cm. Vzdálenost kolektoru od zvlákňovací elektrody je možné nastavit od 0 do 50 cm. Jako pohon (4) kolektoru slouží bruska (Narex EBK 30-8), která umožňuje rychlost otáčení 0 až 61 000 RPM. Pro lepší stabilitu rotace je kolektor poháněn z obou stran.

Na aparatuře byly provedeny předběžné testy. Jako testovací polymery byly použity

polyvinyl butyral a PCL. Bylo potvrzeno, že je možné dosáhnout stabilní produkce v kombinaci s horizontálním posunem zvláknovací elektrody. Při horizontálním posunu nedocházelo k trhání nanovláknenné vlečky a vlákna tvořila na kolektoru rovnoměrnou vrstvu. Rychlost rotace kolektoru je možné velice přesně nastavit tak, že je možné určit charakter sbíraných vláken.



*Obrázek 13: Fotografie zkonstruované aparatury. Aparatura je složena z hliníkové konstrukce o šířce 50 cm. Je vybavena pneumatickým pohonem (1), který umožňuje horizontální pohyb pro plastový modul (2), který slouží pro uchycení zvláknovací elektrody. Nad elektrodou je umístěn kolektor. Vzdálenost kolektoru od elektrody je nastavitelná až do 50 cm. Rotační pohyb kolektoru je zajištěn bruskou (4), a může dosáhnout otáček od 0 do 61 000RPM.*

## 5. Závěr

Během práce se podařilo připravit nanovláknenné vrstvy z polykaprolaktonu (PCL) technologií elektrospinningu s použitím různých alternativních rozpouštědlových systémů. Přidáním několika kapek (20 – 120  $\mu\text{l}$ ) kyseliny mravenčí, případně kyseliny octové do roztoku PCL (rozpuštědlový systém chloroform:etanol 9:1) se podařilo výrazně snížit průměry vláken a současně zachovat biokompatibilitu tohoto materiálu. Přidáním kyseliny octové se podařilo snížit průměry vláken z 2,2  $\mu\text{m}$  až na 158 nm a v případě kyseliny mravenčí na 256 nm. To lze považovat za zásadní úspěch, vzhledem k tomu, že chloroform jako rozpouštědlo je přijatelný pro použití v medicíně, ovšem sám o sobě umožňuje výrobu pouze mikrovláken PCL, což je pro aplikace limitující. Vzhledem k tomu, že tato vlákna jsou připravena z netoxického roztoku, mohou být uplatněna, mimo jiné, v tkáňovém inženýrství. Jedná se o submikronová vlákna, tedy vlákna podporující adhezi buněk [20]. Současně průměrná velikost pórů je menší, než 1  $\mu\text{m}$ . To znamená, že tato vrstva je vhodná pro adhezi buněk, ale současně je pro ně zcela neprostupná [17]. Díky tomu může být použita jako vnitřní vrstva cévního tkáňového nosiče sloužící k adhezi endotelů a současně bránící hladkým svalovým buňkám v narušení endotelové vrstvy.

Dále byly připraveny PCL tkáňové nosiče technologií střídavého elektrického zvlákňování. Jako rozpouštědlový systém pro PCL byla použita bezvodá kyselina octová a octan sodný pro zvýšení vodivosti roztoku. Vlákna PCL byla sbírána na rotující kolektor o průměru 6 mm. Byly připraveny vláknenné vzorky s průměry vláken 490 nm, 870 nm a 1,57  $\mu\text{m}$ . Obrazová analýza ukázala, že všechny vzorky vykazovaly orientovanou vláknennou strukturu. U vzorků byly dále měřeny mechanické vlastnosti. Přestože je toto měření zatíženo značnou nejistotou, z výsledků se dá vyvozovat, že modul pružnosti a mez pevnosti připravených materiálů jsou řádově srovnatelné s vlastnostmi přírodní cévy [48], [49]. Na základě předchozích pokusů byla také navržena a sestrojena aparatura vybavená horizontálním posuvem zvlákňovací elektrody. Tato aparatura bude sloužit ke sběru vláken připravených střídavým elektrickým zvlákňováním a umožní výrobu homogenních vzorků. Nanovláknna připravená elektrickým střídavým zvlákňováním se jeví jako nadějný materiál pro vytvoření druhé vrstvy cévního tkáňového nosiče, přestože je stále třeba vyhodnotit jeho biologické vlastnosti a také porozitu vzorků s různými průměry vláken.

## Seznam použité literatury:

- [1] LANZA, Robert; LANGER, Robert; VACANTI, Joseph P. (ed.). *Principles of tissue engineering*. Academic press, 2011.
- [2] MA, Peter X.; ELISSEEFF, Jennifer (ed.). *Scaffolding in tissue engineering*. CRC press, 2005. PALLUA, Norbert; SUSCHEK, Christoph V. (ed.). *Tissue engineering: from Lab to Clinic*. Springer Science & Business Media, 2010.
- [3] MILAN, Kraljiček, et al. *Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění*. Grada Publishing as, 2007.
- [4] POKORNY, P., et al. Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014, 16.48: 26816-26822.
- [5] TILLMAN, Bryan W., et al. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials*, 2009, 30.4: 583-588.
- [6] SHIN'OKA, Toshiharu; IMAI, Yasuharu; IKADA, Yoshito. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *New England Journal of Medicine*, 2001, 344.7: 532-533.
- [7] SHIN'OKA, Toshiharu, et al. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2005, 129.6: 1330-1338.
- [8] L'HEUREUX, Nicolas; MCALLISTER, Todd N.; DE LA FUENTE, Luis M. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *New England Journal of Medicine*, 2007, 357.14: 1451-1453.
- [9] KONIG, Gerhardt, et al. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials*, 2009, 30.8: 1542-1550.
- [10] YALCIN, I., et al. Design of Polycaprolactone Vascular Grafts. *Journal of Industrial Textiles*, 2014, 1528083714540701.
- [11] NEREM, Robert M. Role of mechanics in vascular tissue engineering. *Biorheology*, 2003, 40.1, 2, 3: 281-287.
- [12] GUNATILLAKE, Pathiraja A.; ADHIKARI, Raju. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 2003, 5.1: 1-16.
- [13] HUTMACHER, D. W.; GOH, J. C. H.; TEOH, S. H. An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *ANNALS-ACADEMY OF MEDICINE SINGAPORE*, 2001, 30.2: 183-191.
- [14] KESSICK, Royal; FENN, John; TEPPER, Gary. The use of AC potentials in electrospinning and electrospinning processes. *Polymer*, 2004, 45.9: 2981-2984.
- [15] MAHESHWARI, Siddharth; CHANG, Hsueh-Chia. Assembly of Multi-Stranded Nanofiber Threads through AC Electrospinning. *Advanced Materials*, 2009, 21.3: 349-354.
- [16] BOLAND, Eugene D., et al. Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly (glycolic acid) for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials*

*Research Part B: Applied Biomaterials*, 2004, 71.1: 144-152.

- [17] SZENTIVANYI, Andreas, et al. Electrospun cellular microenvironments: understanding controlled release and scaffold structure. *Advanced drug delivery reviews*, 2011, 63.4: 209-220.
- [18] LOWERY, Joseph L.; DATTA, Néha; RUTLEDGE, Gregory C. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) fibrous mats. *Biomaterials*, 2010, 31.3: 491-504.
- [19] BAJI, Avinash, et al. Electrospinning of polymer nanofibers: effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites science and technology*, 2010, 70.5: 703-718.
- [20] CHEN, MING, et al. Optimization of electrospinning process parameters for tissue engineering scaffolds. *Biophysical Reviews and Letters*, 2006, 1.02: 153-178.
- [21] SOLIMAN, Sherif, et al. Multiscale three-dimensional scaffolds for soft tissue engineering via multimodal electrospinning. *Acta biomaterialia*, 2010, 6.4: 1227-1237.
- [22] BOWALD, S.; BUSCH, C.; ERIKSSON, I. Absorbable material in vascular prostheses: a new device. *Acta Chirurgica Scandinavica*, 1979, 146.6: 391-395.
- [23] VAZ, C. M., et al. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. *Acta biomaterialia*, 2005, 1.5: 575-582.
- [24] WU, Huijun, et al. Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2010, 21.12: 3207-3215.
- [25] JU, Young Min, et al. Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels. *Biomaterials*, 2010, 31.15: 4313-4321.
- [26] LEE, Chang Hun, et al. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials*, 2005, 26.11: 1261-1270.
- [27] ZHU, Yabin, et al. Macro-alignment of electrospun fibers for vascular tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2010, 92.2: 508-516.
- [28] DEL GAUDIO, Costantino, et al. Structural characterization and cell response evaluation of electrospun PCL membranes: micrometric versus submicrometric fibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, 89.4: 1028-1039.
- [29] TEO, W. E.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun fibre bundle made of aligned nanofibres over two fixed points. *Nanotechnology*, 2005, 16.9: 1878.
- [30] KIM, GeunHyung; KIM, WanDoo. Formation of oriented nanofibers using electrospinning. *Applied physics letters*, 2006, 88.23: 233101.
- [31] TEO, W. E.; RAMAKRISHNA, S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, 2006, 17.14: R89.
- [32] YEE, Wu Aik, et al. Morphology, polymorphism behavior and molecular orientation of electrospun poly (vinylidene fluoride) fibers. *Polymer*, 2007, 48.2: 512-521.
- [33] SUNDARAY, Bibekananda, et al. Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. *Applied physics letters*, 2004, 84.7: 1222-1224.
- [34] KATTA, P., et al. Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector. *Nano letters*, 2004, 4.11: 2215-2218.

- [35] THERON, A.; ZUSSMAN, E.; YARIN, A. L. Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres. *Nanotechnology*, 2001, 12.3: 384.
- [36] GRASL, Christian, et al. Electrodynamic control of the nanofiber alignment during electrospinning. *Applied Physics Letters*, 2013, 102.5: 053111.
- [37] EDWARDS, Matthew D., et al. Development of orientation during electrospinning of fibres of poly ( $\epsilon$ -caprolactone). *European Polymer Journal*, 2010, 46.6: 1175-1183.
- [38] ROSENBERG, Murray D. Cell guidance by alterations in monomolecular films. *Science*, 1963, 139.3553: 411-411.
- [39] XU, C. Y., et al. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials*, 2004, 25.5: 877-886.
- [40] KANANI, A. Gholipour; BAHRAMI, S. Hajir. Effect of changing solvents on poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibrous webs morphology. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 2011: 31.
- [41] VAN DER SCHUEREN, Lien, et al. An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. *European Polymer Journal*, 2011, 47.6: 1256-1263.
- [42] LEE, Sang Jin, et al. In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2007, 83.4: 999-1008.
- [43] HE, Wei, et al. Tubular nanofiber scaffolds for tissue engineered small-diameter vascular grafts. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2009, 90.1: 205-216.
- [44] LAWSON, Caitlin, et al. Rapid fabrication of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers using needleless alternating current electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science*, 2016, 133.13.
- [45] LI, Wan-Ju, et al. Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of biomechanics*, 2007, 40.8: 1686-1693.
- [46] Pham, Q. P., Sharma, U., & Mikos, A. G. (2006). Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue engineering*, 12(5), 1197-1211.
- [47] HONG, Yi, et al. A small diameter, fibrous vascular conduit generated from a poly (ester urethane) urea and phospholipid polymer blend. *Biomaterials*, 2009, 30.13: 2457-2467.
- [48] SELL, S. A., et al. Electrospun polydioxanone–elastin blends: potential for bioresorbable vascular grafts. Disclosure. Several authors have United States and International patents pending concerning technology presented in this article, and this technology has been licensed to NanoMatrix, Inc., in which several authors have a financial interest. *Biomedical Materials*, 2006, 1.2: 72.
- [49] GAUVIN, Robert, et al. Mechanical properties of tissue-engineered vascular constructs produced using arterial or venous cells. *Tissue Engineering Part A*, 2011, 17.15-16: 2049-2059.
- [50] [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Arterie\\_vena.png](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Arterie_vena.png) [Obrázek]
- [51] <http://www.experimentation-online.co.uk/article.php?id=1141> [Obrázek]

